

**VYSOKÁ ŠKOLA BÁŇSKÁ -  
TECHNICKÁ UNIVERZITA OSTRAVA**

Hornicko-geologická fakulta  
Institut environmentálního inženýrství

**EKOTOXICITA PŮD V OBLASTI RYBÍ  
U NOVÉHO JIČÍNA**

diplomová práce

**Autor práce:**

Eliška Hrynyšinová

**Vedoucí diplomové práce:**

prof. Ing. Helena Raclavská, CSc.

Ostrava 2015

**VŠB – TECHNICAL UNIVERSITY OF OSTRAVA**

Faculty of mining and geology

Institute of environmental engineering

**SOIL ECOTOXICITY IN RYBÍ AREA  
AT NOVÝ JIČÍN**

THESIS

Author:

Eliška Hrynyšínová

Supervisor:

prof. Ing. Helena Raclavská, CSc.

Ostrava 2015

VŠB - Technická univerzita Ostrava  
Hornicko-geologická fakulta  
Institut environmentálního inženýrství

## Zadání diplomové práce

Student: **Bc. Eliška Hrynyšínová**  
Studijní program: N2102 Nerostné suroviny  
Studijní obor: 3904T005 Environmentální inženýrství  
Téma: Ekotoxicita půd v oblasti Rybí  
Soil ecotoxicity in Rybí area

Zásady pro vypracování:

1. Úvod a cíl práce
2. Metody stanovení toxicity půd
3. Těžké kovy v půdách a jejich vliv na ekotoxicitu
4. Formy výskytu kovů a metaloidů v půdách
5. Charakteristika vodného výluhu z půd
6. Srovnání výsledků ekotoxikologických testů (kontaktní testy) a výsledky inhibice na *Vibrio fischeri*
7. Vlivy ostatních půdních parametrů na inhibici
8. Vyhodnocení a závěr

Seznam doporučené odborné literatury:

An J., Jeong S., Moon H.S., Jho E.H., Nam K. (2012): Prediction of Cd and Pb toxicity to *Vibrio fischeri* using biotic ligand-based models in soil. *Journal of Hazardous Materials*. V. 203– 204,69 – 76

Burga Pérez K.F., Charlatchka R., Sahli L., Féraud J.F. (2012): Short Communication. New methodological improvements in the Microtox solid phase assay. *Chemosphere*. V 86, 105–110

Čvančarova M., Křesinova Z., Cajthaml T. (2013): Influence of the bioaccessible fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons on the ecotoxicity of historically contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. V. 254– 255,116–124

Kováts N., Ács A., Kovács A., Ferincz A., Turóczy B., Gelencsér A. (2012): Short communication. Direct contact test for estimating the ecotoxicity of aerosol samples. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, V.33, 284-287.

Lappalainen J., Juronen R., Nurmi J., Karp M (2001): Automated color correction method for *Vibrio fischeri* toxicity test. *Chemosphere*. V.45, 635-641.

Ma X.Y., Wang C.X., Ngo H.H., Guo W., Wu N.M., Wang Na. (2014): Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. *Science of the Total Environment*. V. 468–469, 1–11.


Rocha L., Rodrigues S.M., Lopes I., Soares A.M.V.M., Duarte A.C., Pereira E. (2011): The water-soluble fraction of potentially toxic elements in contaminated soils: Relationships between ecotoxicity, solubility and geochemical reactivity. *Chemosphere*. V. 84, 1495–1505.

Formální náležitosti a rozsah diplomové práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách fakulty.


Vedoucí diplomové práce: **prof. Ing. Helena Raclavská, CSc.**

Datum zadání: 31.10.2014

Datum odevzdání: 30.04.2015

  
doc. Dr. Ing. Radmila Kučerová  
vedoucí institutu



  
prof. Ing. Vojtech Dimer, CSc.  
děkan fakulty

### **Prohlášení**

*Celou diplomovou práci včetně příloh, jsem vypracovala samostatně a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.*

*Byla jsem seznámena s tím, že na moji diplomovou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. - autorský zákon, zejména § 35 – využití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a využití díla školního a § 60 – školní dílo.*

*Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB-TUO) má právo nevýdělečně, ke své vnitřní potřebě, diplomovou práci užít (§ 35 odst. 3). Souhlasím s tím, že jeden výtisk diplomové práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB-TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího diplomové práce. Souhlasím s tím, že údaje o diplomové práci, obsažené v Záznamu o závěrečné práci, umístěném v příloze mé diplomové práce, budou zveřejněny v informačním systému VŠB-TUO.*

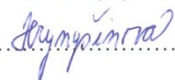
*Souhlasím s tím, že diplomová práce je licencována pod Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported licenci. Pro zobrazení kopie této licence, je možno navštívit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>*

*Bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu o komerční využití z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona.*

*Bylo sjednáno, že užít své dílo – diplomovou práci nebo poskytnout licenci k jejímu komerčnímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB-TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).*

V Ostravě dne: 24.4.2015

Eliška Hrynyšinová

.....

### **Poděkování:**

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí diplomové práce prof. Ing. Heleně Raclavské, CSc., za laskavou a ochotnou pomoc, cenné připomínky a odborné vedení. Dále velmi děkuji Bc. Janě Sýkorové a Ing. Silvii Bieleškové, za pomoc v laboratoři při zpracování praktické části diplomové práce. Analýzy byly zajištěny v laboratoři Institutu geologického inženýrství, VŠB – TUO.

Velké poděkování patří také mé rodině a přátelům, kteří mi byli oporou po celou dobu studia.

## ANOTACE

Tato práce se zabývá ekotoxicitou půd v oblasti Rybí u Nového Jičína. Ekotoxicitou se rozumí vliv toxických látek v půdě na životní prostředí. Při realizaci diplomové práce jsem vycházela ze vzorků půdy, které byly odebrány v řešení bakalářské práce. Ekotoxikologické testy byly provedeny na celkem 56-ti vzorcích lesních půd a půd v intravilánu obce, přičemž pro testy toxicity jsem použila dva organismy: bakterii *Vibrio fischeri* a chvostoskoka *Folsomia candida*. Výsledkem je vyhodnocení výsledků inhibice na *Vibrio fischeri*, které zahrnují závislosti inhibice na různých faktorech (pH, celkový obsah kovů, apod.). Součástí práce je zhodnocení reprodukčního testu na chvostoskoku *Folsomia candida*, který byl testován na studovaných půdách. Výsledky testu ukázaly, že inhibice nepřesahuje 20 %.

**Klíčová slova:** půda, ekotoxicita, těžké kovy, kontaktní test, inhibice, *Vibrio fischeri*

## SUMMARY

This work deals with ecotoxicological soil in Rybí area at Novy Jicin. Ecotoxicity means the influence of toxic substances in the soil environment. In the implementation of this thesis, I drew from soil samples that were removed in solution of this thesis. Ecotoxicological tests were conducted on a total of 56 samples forest soils and soils in the urban area, while for toxicity tests , I used two organisms: bacteria *Vibrio fischeri* and springtail *Folsomia candida*. The result is evaluation results on the inhibition of *Vibrio fischeri*, which include inhibition depending on various factors (pH, total metal content, etc.). Part of this work is to evaluate the reproductive test springtail *Folsomia candida*, which was tested on the studied soils. Test results showed that the inhibition does not exceed 20 %.

**Keywords:** soil, ecotoxicity, heavy metals, contact test, inhibition, *Vibrio fischeri*

## OBSAH

<b>ÚVOD A CÍL PRÁCE.....</b>	<b>1</b>
<b>1 VYMEZENÍ POJMU EKOTOXIKOLOGIE, EKOTOXICITA .....</b>	<b>4</b>
1.1 Pohyb škodlivých látek v prostředí .....	4
1.2 Vztah expozice, účinku a dávky.....	5
1.3 Chování toxikantů .....	5
1.3.1 Polarita látek .....	6
1.3.2 Formy výskytu kovů .....	6
1.4 Velikost účinku a toxické indexy .....	6
1.5 Půdní organismy .....	7
1.6 Vlivy půdních parametrů na ekotoxicitu.....	7
1.6.1 Vliv organických látek na ekotoxicitu .....	7
<b>2 METODY STANOVENÍ TOXICITY PŮD.....</b>	<b>8</b>
2.1 Charakteristika bakterie <i>Vibrio fischeri</i> .....	9
2.2 Měřicí zařízení .....	10
2.3 Měření luminiscence .....	10
2.1 Rozdělení metod pro stanovení ekotoxicity .....	12
2.1.1 Výluhové a kontaktní testy .....	13
2.1.2 Bioindikační metody .....	13
2.1.3 Klasické, standardní testy .....	14
2.1.4 Mikrobiotesty.....	14
2.1.5 Biosenzory, biosondy .....	15
2.1.6 Specifické testy toxicity .....	15
<b>3 TĚŽKÉ KOVY V PŮDÁCH A JEJICH VLIV NA EKOTOXICITU.....</b>	<b>16</b>
3.1 Rizikové prvky a mikroorganismy .....	17
<b>4 FORMY VÝSKYTU KOVŮ A METALOIDŮ V PŮDÁCH .....</b>	<b>18</b>
<b>5 REPRODUKČNÍ TEST NA CHVOSTOSKOKU <i>FOLSOMIA CANDIDA</i> .....</b>	<b>21</b>
5.1 Podmínky biotestu .....	22
5.2 Průběh biotestu .....	22
5.3 Výsledky biotestu.....	22
<b>6 CHARAKTERISTIKA VODNÉHO VÝLUHU Z PŮD A PŮDNÍ SUSPENZE .</b>	<b>24</b>
<b>7 VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ .....</b>	<b>25</b>



7.1	<i>Výsledky statistické analýzy - vodný výluh</i>	27
7.2	<i>Výsledky statistické analýzy – suspenze</i>	29
7.3	<i>Závislost mezi obsahem rozpuštěných látek vyjádřených jako vodivost a inhibicí (měřeno v suspenzi)</i>	30
7.4	<i>Srovnání inhibice <i>Vibrio fischeri</i> pro vodný výluh a suspenzi</i>	31
7.5	<i>Výsledky zákalu a jeho závislost na inhibici</i>	33
7.6	<i>Obsah kovů ve vodném výluhu</i>	36
7.7	<i>Srovnání obsahů kovů ve vodném výluhu s doposud publikovanými hodnotami</i>	40
<b>8</b>	<b>ZÁVĚR</b>	<b>42</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b>	<b>44</b>
	<b>INTERNETOVÉ ODKAZY</b>	<b>48</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ</b>	<b>49</b>
	<b>SEZNAM TABULEK</b>	<b>49</b>
	<b>SEZNAM GRAFŮ</b>	<b>49</b>
	<b>PŘÍLOHY</b>	<b>51</b>

## ÚVOD A CÍL PRÁCE

V této práci je sledována ekotoxicita půd v oblasti Rybí u Nového Jičína. Ekotoxicita vyjadřuje vlastnost látek, které mají nepříznivých vliv (okamžitý nebo opožděný) na životní prostředí. Škodliviny jsou bioakumulovány nebo mohou působit toxicky na biotu (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

Rizikovost těžkých kovů se odvíjí od jejich biodostupnosti pro živé organismy, která je často dána půdními vlastnostmi (pH, redox potenciál, množství a typ organické hmoty, zastoupení jílových minerálů). Biologická dostupnost a toxicita je nezbytná pro efektivní ekologické posuzování kontaminace půdy. Toxicita roste s podmínkami, při kterých se prvky uvolňují z organických vazeb a v podobě iontů jsou dostupné pro živočichy, rostliny, půdní mikroflóru a mikrofaunu. Obecně lze říci, že dostupnost kovů v půdě narůstá s klesající hodnotou pH (ŠUDOMA, 2013; LUO, 2014).

Je pravdou, že většina těžkých kovů je v nízkých koncentracích pro organismy nutná, ale ve vyšších koncentracích působí toxicky. Většinou jsou tyto prvky součástí sloučenin a toxicita je závislá na formě výskytu (RACLAVSKÝ et al., 2009).

Obecně lze říci, že koncentrace kovů v půdě neodpovídají dostupnosti půdní bioty. K tomuto jevu dochází zejména v důsledku složitých vztahů mezi kovy a složkami půdy (organický uhlík, jílové minerály,...) a půdní roztok (rozpuštěný organický uhlík, pH, kationty/anionty), který běžně změní biologickou dostupnost. Abychom mohli posoudit rizika, je důležité stanovit biologickou dostupnost a toxicitu kovů kontaminované půdy (ČVANČAROVÁ, 2013).

Tímto tématem bych ráda navázala na svou bakalářskou práci (Těžké kovy v půdách v oblasti Rybí u Nového Jičína). V rámci bakalářské práce jsem zjistila obsahy vybraných rizikových prvků na celkem 56–ti vzorcích lesních půd a půd odebraných v intravilánu obce. S těmito půdními vzorky budu pracovat i nadále. Jsem obyvatelkou obce Rybí a tak mě zajímá, jestli zjištěné obsahy rizikových prvků mohou mít vliv na životní prostředí, tzn. na živé organismy v půdě, rostliny a celkovou biotu. Z tohoto důvodu jsem se rozhodla, zjistit míru toxicity, a to pomocí ekotoxikologických testů, kdy je organismus vystaven různým koncentracím testované látky. V této práci se zaměřím na testování pomocí bakterie *Vibrio fischeri* a chvostoskoka.

Zájmové území Rybí je známé výskytem hornin těšínitové asociace. Horniny těšínitové asociace patří mezi vyvřeliny, pro které jsou typické vyšší koncentrace stopových prvků (Cr, Co, Ba, Ni, Sr, Ti, Cu, Zn, apod.) Dále jsou zde výskyty sedimentárních hornin (pískovce a vápence). V půdách intravilánu obce jsou zvýšené koncentrace olova a zinku. Příčinou může tedy být doprava, protože olovo se uvolňuje z brzdového obložení. Zvýšené koncentrace zinku byly zjištěny v povrchovém horizontu.

Zinek poskytuje statisticky významné korelační závislosti s vápníkem, a proto lze předpokládat, že jeho zvýšený výskyt souvisí s charakterem podložních hornin (HRYNYŠINOVÁ, 2013).

Zvýšené ekotoxické účinky očekávám zejména u vzorků půdy, kde rizikové prvky přesahují práh geochemické anomálie (tzn. zvýšený obsah rizikového prvku je tehdy, pokud je naměřená koncentrace prvků větší než práh geochemické anomálie). Lze předpokládat, že zvýšená koncentrace prvků může způsobit i vyšší obsahy prvků ve vodném výluhu. Toxické účinky rizikových prvků lze testovat na vhodném bioindikátoru, kterým je v mém případě luminiscenční bakterie *Vibrio fischeri* a chvostoskok. Bioindikace je metoda, která na základě chování a vlastností živého systému usuzuje na vlastnosti toxikantů v přirozeném prostředí (ANDĚL, 2011).

Půda tvoří základní stavební kámen terestrických ekosystémů a je důležitá jak pro člověka, tak pro přírodu. Tvoří filtrační zónu pro vodu, vzduch a prostředí pro rostlinnou produkci (KOČÍ, 2003). Význam ochrany půdního fondu spočívá v ekologické produkční funkci. Půda má zásadní a nezastupitelnou roli ve stabilitě ekosystémů, ovlivňuje bilanci látek, je regulátorem koloběhu látek, funguje jako úložiště a její kvalita předurčuje i kvalitu ostatních složek životního prostředí (PROKEŠ et al., 2005). Škodlivé látky v půdě, které mohou mít negativní vliv na živé organismy a ekosystém, studuje interdisciplinární vědní obor ekotoxikologie, který má za úkol, zjišťovat interakce chemických látek s organismy (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

Cílem práce je stanovení toxického účinku vybraných rizikových prvků na bakterii *Vibrio fischeri* a chvostoskoka *Folsomia candida* (ve vzorku půd). Stanovení inhibice na *Vibrio fischeri* bylo prováděno ve vodném výluhu, tzn., že se posuzuje jen účinek vodorozpustné formy rizikových prvků, u chvostoskoka se posuzuje celkový obsah prvků v půdě. Pro dosažení tohoto cíle budu vycházet z následujícího postupu:

- Stanovení inhibičního účinku obsahu rizikových prvků ve vodném výluhu na světelnou emisi *Vibrio fischeri*  
(ČSN EN ISO 11348 - 3)
- Stanovení inhibičního účinku obsahu rizikových prvků v suspenzi na světelnou emisi *Vibrio fischeri*  
(ČSN ISO 21338)
- Stanovení inhibice reprodukce chvostoskoků  
(ČSN ISO 11267, OECD 232, vyhláška č. 257/2009 Sb.)
- Vliv půdních parametrů na inhibici

# 1 VYMEZENÍ POJMU EKOTOXIKOLOGIE, EKOTOXICITA

Toxicitou se zabývá obor, nazývajícím se toxikologie. Jedná se o nauku, která studuje škodlivé působení látek na člověka. Ekotoxikologie rozšiřuje tento pojem o zaměření na ostatní živé organismy. Je to tedy hraniční obor mezi toxikologií a ekologií, který se zabývá působením cizorodých látek na volně žijící organismy v prostředí, kde se vyskytují. Obecná definice ekotoxikologie říká, že je to věda, která se zabývá negativním působením toxikantů na biosystémy. Toxikantem se rozumí chemická látka nebo směs látek a biosystém označuje živý systém. Podle francouzského vědce René Truhauta, který tento termín zavedl v roce 1969, je ekotoxikologie „**studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva**“, je postavena na základech toxikologie a ekologie, ale zároveň využívá i jiné vědní obory, jako je například fyzika, geologie, chemie, pedologie, klimatologie, hydrochemie, apod. Cílem tohoto vědního oboru je, rozšiřovat poznatky o působení chemických látek na živé systémy a to na úrovni od buňky až po biosféru (ANDĚL, 2011; PROKEŠ et al., 2005; HORÁK et al., 2007).

Cílem ekotoxikologie, je poznat vazbu mezi toxickou látkou a živým organismem v prostředí, a to na všech úrovních. Dalším úkolem je využít poznatky pro ochranu živých organismů, populací a společenstev před chemickým znečištěním (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

## 1.1 Pohyb škodlivých látek v prostředí

Znečišťující látky se do prostředí dostávají prostřednictvím různých zdrojů a jejich transport je dán jejich fyzikálně – chemickými vlastnostmi. Následně jsou tyto látky součástí biochemických cyklů v jednotlivých složkách životního prostředí. Do organismu se látka dostává při dýchání nebo potravou a následně dochází k přeměně na neškodné metabolity, které se vyloučí, nebo vzniknou škodlivé a reaktivní produkty. Tyto cizorodé látky mohou mít na organismus vliv, a to letální či subletální. Často může dojít k biotransformaci, bioakumulaci nebo přenosu na další organismy přes potravní řetězec. Následně vzniká odezva v populaci, společenstvu a ekosystému (PROKEŠ et al., 2005; ANDĚL, 2011).

## 1.2 Vztah expozice, účinku a dávky

Hlavním metodickým určením ekotoxicity je vztah mezi expozicí a účinkem. Expozicí nazýváme stav, kdy je toxikant v přímém kontaktu s biosystémem. Účinek je pak změna, kterou toxikant svým působením biosystému vyvolá, tzn. odpověď organismu na expozici látkou (ANDĚL, 2011; PAVLÍKOVÁ et al., 2009). Rozhodující je množství dávky, které se do organismu dostane, tzn. které je do organismu absorbováno. Dávka se udává v jednotkách hmotnosti organismu za jednotku času ( $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Respektive, škodliviny jsou děleny podle dávky, která usmrtí dospělého jedince. V tabulce č. 1 lze vidět rozdělení toxicity látky podle kritéria WHO (World Health Organization) a EPA (Environmental Protection Agency). Další způsob, jak třídit toxické látky, je rozdělení dle LD50, což je dávka, při níž uhynie 50% jedinců z daného souboru. Účinek může být akutní nebo chronický. Akutní účinek je bezprostřední, již po jedné dávce toxické látky, zatímco chronický účinek se projeví po dlouhém styku s látkou. Čím nižší je číselná hodnota LD50, tím je látka toxičtější (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

Charakteristika dávky - jedovatost	Kritéria WHO	Potkan LD50 (mg/kg)	Kritéria EPA	Potkan LD50 (mg/kg)
Extrémně jedovatá	Ia	< 5	I	< 50
Silně jedovatá	Ib	5 - 50	II	50 - 500
Jedovatá	II	50 - 500	III	500 - 5000
Slabě jedovatá	III	>500	IV	>5000

Tabulka 1: Dělení toxických látek podle kritérií WHO (Světová zdravotnická organizace) a EPA (Úřad pro ochranu ŽP v USA (PAVLÍKOVÁ et al., 2009)

## 1.3 Chování toxikantů

Je zde mnoho fyzikálních a chemických vlastností, které ovlivňují chování toxikantů v prostředí (chemická a prostorová struktura, molekulová hmotnost, rozpustnost ve vodě, polarita, apod.). Mezi dvě hlavní oblasti, které se řeší nejčastěji, je polarita látek (ovlivňuje pohyb látek v prostředí a organismu) a forma výskytu kovů v prostředí

(ANDĚL, 2011). Hlavní vlastností toxikantu je toxicita, což je schopnost toxikantu poškozovat živý organismus (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

### **1.3.1 Polarita látek**

Tato vlastnost je dána rozložením náboje v molekule, který má vliv na rozpustnost sloučeniny, na sorpční a desorpční vlastnosti a celkovou reaktivitu (ANDĚL, 2011).

### **1.3.2 Formy výskytu kovů**

Těžké kovy se řadí mezi významné toxikanty. Chování kovů v životním prostředí a jejich účinky na organismy je závislé na chemické a fyzikální formě, ve které se kov vyskytuje. Jedná se o tzv. speciaci. Při ekotoxikologickém testování je forma výskytu velmi důležitá a musí být brán zřetel i na tzv. biodostupnost kovu, což je podíl z celkové koncentrace, která je v hodnocené složce prostředí přítomna. Pro analýzu půd se stupeň uvolnitelnosti kovů z matrice znázorňuje různými typy výluhů (ANDĚL, 2011).

## **1.4 Velikost účinku a toxické indexy**

Účinnost testované chemické látky lze vyjádřit pomocí tzv. toxických indexů v jednotkách dávky nebo koncentrace. Závisí na povaze organismu, na kterém je látka testována, na charakteru expozice a na daném prostředí. Například toxicitu vzhledem vodním živočichům lze vyjádřit v koncentraci účinného roztoku látky. Koncentrace se používá v případě, kdy se hodnotí toxicita látky obsažené v daném prostředí (půda, voda, vzduch,...) a působí a po určitou předepsanou dobu. Jednotky dávky lze zařadit v případě, že podáváme chemikálii přímo do organismu. Jednotky lze použít hmotnostní (g, mg, apod.) nebo jsou vyjádřeny v molech (TICHÝ, 1998).

Toxické indexy, používané při hodnocení toxicity, přímo souvisí se závislostí účinků na dávce (koncentraci). Patří zde například LD50, což je tzv. smrtná dávka, při které zahyne 50% jedinců z testovaného souboru (TICHÝ, 1998; TŘEBICHA VSKÝ, 1998).

## 1.5 Půdní organismy

Půda tvoří pro půdní organismy životní prostředí. Půdní ekotoxikologie často využívá sledování těchto půdních organismů, které tvoří až 90% biomasy. Z půdních bezobratlých jsou často využívány roupice, hlístice, žížaly, plži, chvostoskoci, korýši, roztoči či hmyz (KOČÍ, 2003).

## 1.6 Vlivy půdních parametrů na ekotoxicitu

Podle Tsiridise et al. (2006), rozpustnost, biologická dostupnost a toxicita jsou závislé na fyzikálně – chemických parametrech zeminy, jako je např.:

- pH
- kationová výměnná kapacita
- obsah jílu
- obsah organických látek (humínové kyseliny)
- interaktivní účinky

### 1.6.1 Vliv organických látek na ekotoxicitu

Zkoumání vlivu huminových kyselin ukázalo, že toxicita se mění v závislosti na typu těžkých kovů a koncentraci huminových kyselin. Ve studii Tsiridise et. al (2006) bylo zjištěno, že snížení toxického účinku v důsledku tvorby komplexů, byl pozorován v případě Cu. Co se týká schopnosti tvořit komplexy, Cu má značnou vazebnou účinnost, zatímco vazebná účinnost Zn je velmi nízká. Tento fakt je v souladu i s jinými studiemi, kdy bylo prokázáno, že Cu snadno tvoří komplexy s jinými organickými ligandy, což vede ke snížení toxického účinku. V případě Pb je účinek opačný, jelikož v případě komplexů tvoří biologicky dostupnější formu než v rozpustné formě. Lze říci, že schopnost rizikových prvků, tvořit komplexy, je důležitým parametrem, který může ovlivnit toxicitu a biologickou dostupnost rizikových prvků ve vodních systémech. Dále bylo v této studii prokázáno, že existuje interaktivní účinek mezi Cu a Zn a mezi Pb a Zn při testování na bakterii *V. fischeri*. Způsob interakce závisí na typu dvojice kovů, nikoli na testované koncentraci (TSIRIDIS ET AL., 2006).



## 2 METODY STANOVENÍ TOXICITY PŮD

Zvýšená pozornost vlivu toxických látek na životní prostředí vede k rozvoji citlivých a pozorovatelných organismů, tzv. bioindikátorů životního prostředí, kteří mohou sloužit ke sledování a analýze znečištění. Ve srovnání s chemickou analýzou, která je schopna určit pouze koncentrace znečišťujících látek uvolňovaných do ŽP, biologická analýza může odhalit účinky znečišťujících látek na organismy a ukázat mechanismus toxických účinků. Biologická analýza je však časově náročná a vyžaduje pěstování speciálních organismů. Tato metoda se však stává velmi potřebnou, jelikož vliv nečistot na přírodní ekosystémy je velký a je třeba najít rychlý, pohodlný a efektivní způsob, jak posoudit biologickou toxicitu (MA, 2014).

Jednou z metod, jak určit ekotoxicitu půd, je stanovení ekotoxicity pomocí bakterie *Vibrio fischeri*. Hlavní nevýhoda tohoto testování spočívá v tom, že půda a sedimenty často obsahují množství huminových kyselin či těžkých kovů a tak dochází k zabarvení vzorků půdních výluhů a k ovlivnění světelné emise z luminometru, čímž se snižuje ekotoxicita (MA, 2014).

Pro stanovení ekotoxicity klasickou metodou pomocí luminiscenční bakterie se používala ČSN EN ISO 11348 (**Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri***, tzv. Zkouška na luminiscenčních bakteriích. Tato metoda byla široce uznávaná a aplikovaná po dlouhou dobu, avšak velkým problémem stále zůstávala otázka, jak zabránit rušení způsobené zákalem nebo zabarvením na testovaný vzorek. Hodnocení toxicity barevných a zakalených vzorků touto metodou je složitější nebo nemožné v důsledku vlivu prostředí. (KOVÁTS et al., 2012)

V roce 1999 vyvinul Lappalainen J. **nový standard ISO 21338, který byl vydán pro kinetické stanovení inhibičních účinků sedimentů, dalších pevných látek a barevných vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri***, tzv. kinetická zkouška s luminiscenčními bakteriemi (ISO, 2010).

Intenzita světla je stanovena vrcholem luminiscence naměřeném v prvních 30 s působení bakterií na vzorek pro zmírnění nevýhod tradičního standardního protokolu (ISO 11348) a nazývá se „Flash test“. Ve srovnání s klasickou metodou nepovede zákal a zbarvení vzorku k chybnému výsledku toxicity. Zákal a barva vzorku způsobují významný pokles světelného výkonu v důsledku fyzikálních jevů (falešný potenciál). Korekci barvy a zákalu provede tento test automaticky (KOVÁTS et al., 2012).

Existují zásadní rozdíly mezi klasickou metodou (Microtox) a Flash metodou. V systému Flash se vzorky zachází jako se suspenzí. Za druhé, inhibice se vypočítá jiným způsobem. V systémech Microtox je inhibice hodnocena vzhledem ke kontrolnímu vzorku, přičemž v systému Flash je hodnocen světelný výkon ve vzorku nezávisle na ovládní. Výhody normy ČSN EN ISO 21338 jsou následující:

- není detekována žádná falešná toxicita,
- dostatečně citlivé rozdíly v detekci pro různé vzorky,
- je tam přímý zkušební kontakt, který simuluje potenciálně realistickou cestu expozice, která se vyskytuje mezi částicemi a příjemcem biologického systému,
- není třeba používat rozpouštědla za extrémních experimentálních podmínek,
- minimální množství vzorku požadované Flash systémem, je extrémně nízké (KOVÁTS et al., 2012).

## 2.1 Charakteristika bakterie *Vibrio fischeri*

*Vibrio fischeri* se považuje za nejstarší mikrobiální bioindikátor pro test toxicity a ekotoxicity. Tato mořská bakterie má ve svém genetickém vybavení tzv. lux, díky kterému dochází k přeměně energie na bioluminiscenční světlo (LOU, 2014).

Emise světla je spjata s buněčným metabolismem, a tak intenzita světla odráží metabolismus bakterií. Pokud je luminiscenční světlo vystaveno toxickým látkám, intenzita světla rychle klesá (MA et al., 2014; BURGA PÉREZ, 2012).

Metoda inhibice luminiscence bakterie *V. Fischeri* je užitečným nástrojem pro odhad toxicity různých chemických látek. Tento způsob je poměrně rychlý, protože doba inkubace je 5 – 30 minut. Výsledky jsou srovnatelné s jinými zkouškami akutní toxicity (LAPPALAINEN, 2001).

V České republice se tato metoda (Stanovení ekotoxicity bioluminiscenční metodou ve vodném výluhu) provádí podle:

- ČSN EN ISO 11348- 1: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenční bakterii) – část 1: Metoda s čerstvě připravenými bakteriemi. Leden 2000.
- ČSN EN ISO 11348- 2: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenční bakterii) – část 2: Metoda se sušenými bakteriemi. Leden 2000.
- ČSN EN ISO 11348- 3: Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenční bakterii) – část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi. Leden 2000.
- ČSN ISO 21338, *Kvalita vod* - kinetické stanovení inhibičních účinků sedimentů, dalších pevných látek a barevných vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri*, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Březen 2013.

## 2.2 Měřicí zařízení

Světelný výkon luminiscenčních organismů, které vyzařují světlo, jako důsledek dýchání, se zjišťuje luminometrem (LUMISTOX). Principem je reakce, kdy toxické látky ve vzorku vodného výluhu inhibují světelnou emisi bakterií. Podstatou testu, je srovnání luminiscence před a po vystavení toxické látky ve vodném výluhu (KOVÁTS et al., 2012).

Mezi výhody zařízení patří dlouhodobá trvanlivost bakterií, rychlá odpověď a jednoduchý provoz. Doba testování je max. 30 min.

## 2.3 Měření luminiscence

Jedná se o netermický proces, kdy je vyzářeno světelné záření o určité vlnové délce (440 nm, 479 nm, 505 nm). Pokud se jedná o světlo vyzářené v důsledku chemické reakce, hovoří se o chemiluminiscenci. Zvláštním případem je tzv. bioluminiscence. Přirozeně se tato vlastnost vyznačuje u mořských organismů, jako jsou druhy mořských bakterií, korýšů, měkkýšů, ryb, hmyzu, hub či kroužkoveců. Světlo vzniká tak, že molekuly, odpovědné za emisi světla, absorbují volnou energii, která vzniká chemickou reakcí.

Molekuly se tak dostávají do excitovaného stavu a některé periferní elektrony se dostávají na vyšší energetickou hladinu. Následně elektrony ztrácejí energii, vrací se na nižší energetickou hladinu a uvolněná energie se emituje v podobě fotonů (světla). Molekula se dostává zpět do základního stavu, poté co ztratí všechnu absorbovanou energii. Luminiscenční rovnici lze zapsat následujícím způsobem:

Red. lum. látka + oxidant + reaktanty → oxid. lum. látka + další produkty + světlo

Jsou zde 4 složky, nezbytné pro vznik luminiscenčního signálu:

- Luciferin
- Luciferáza
- Oxidant
- Další reaktanty

Jedná se o rozmanité látky, které jsou typické pro odlišné skupiny luminujících organismů (KOČÍ, 2002).

Mezi dobře prozkoumané luminiscenční děje patří reakce, která probíhá v mořských baktériích rodu *Vibrio*, jako je *Vibrio fischeri*. V genomu této bakterie se nachází lux operon luxCDABE, který je sestaven z genů zodpovědných za schopnost buněk luminovat. Lux systém je tvořen ze sedmi genů (*luxA*, *luxB*, *luxC*, *luxD*, *luxE*, *luxR*, *luxI*) (KOČÍ, 2002).

Využívání bioluminiscenční bakterie se datuje do 70. let 20. a to za použití Biotest Microtox, který byl vyroben v roce 1979 pro německou firmu Beckman Instruments. Využívalo se bakterií *Photobacterium phosphoreum*, které dnes známe jako bakterie *Vibrio fischeri*. Testování na těchto baktériích se využívalo pro hodnocení akutní toxicity skládkových nebo vrtných výplachů. V dnešní době je to jeden z nejpoužívanějších biotestů (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

## 2.1 Rozdělení metod pro stanovení ekotoxicity

Jak je zmíněno výše, pro zjištění toxického účinku se používají tzv. ekotoxikologické testy toxicity, kdy se určí často velmi jednoduchý organismus, u kterého jsou dobře známy jeho životní projevy, stavba těla a fyziologie v uměle zhotoveném prostředí a ten je vystaven určité koncentraci látky. Podle reakce organismu se zjišťuje riziko vzniklé z expozice škodlivé látky. Biodostupnost škodlivé látky je dána její chemickou, molekulární formou a rozpustností ve vodě. Pro testy toxicity se musí využívat vhodných bioindikátorů, organismů, u kterých životní projevy znázorní kvalitu prostředí (PROKEŠ et al., 2005).

Dostupnost kontaminantů do půdních organismů (biologická dostupnost) je řízena třemi hlavními procesy:

- chemická dostupnost (fyzikálně – chemicky poháněné mechanismy, které řídí koncentrace znečišťujících látek v půdním roztoku),
  - biologická dostupnost (fyziologicky řízený mechanismus příjmu, specifický pro daný druh)
  - a toxicita (vnitřní mechanismy řízené organismy)
- (ROCHA, 2011).

Testy lze rozdělit podle doby expozice, pokročilosti testovacího systému, trofické úrovně organismu, testované matrice, spektra testovacích organismů, typu testovaného vzorku, způsobu přípravy vzorku, stupně komplexnosti detekčního systému a způsobu vyhodnocení (*Vscht* [online], 2010).

Toxicita závisí na chemické stavbě látky, na cestě vstupu do organismu, na délce expozice, na velikosti dávky a na citlivosti a fyzickém stavu organismu (PROKEŠ et al., 2005). Dle způsobu působení lze účinek toxické látky dělit na:

1. přímý toxický účinek,
2. orgánová toxicita,
3. mutagenní,
4. karcinogenní,
5. teratogenní,
6. biochemický,

7. imunotoxický

(PROKEŠ et al., 2005).

Osud látky v organismu je dán vstupem, distribucí, biotransformací a exkrecí. Z hlediska interakce látky a organismu probíhají tyto čtyři základní procesy:

1. expoziční proces (dostupnost látky pro organismus),
2. toxikokinetický proces (biologická dostupnost, která souvisí s množstvím dávky),
3. toxikodynamický proces (interakce látky s jednotlivými částmi testovaného organismu a to na molekulární úrovni),
4. odpověď organismu

(PAVLÍKOVÁ et al., 2009; KAFKA, 1999).

### 2.1.1 Výluhové a kontaktní testy

Výluhem lze označit převedení látky (přítomné ve vzorku) pevného skupenství do vodného roztoku. Lze převést pouze látky rozpustné ve vodě. Následně je výluh testován příslušným testem toxicity na vodním organismu. Další způsob je tzv. extrakce, která je vhodná pro vzorky zemin obsahující hydrofobní látky. Testy vyluhovatelnosti zahrnují statické testy, dynamické testy a testy vychovatelnosti v nádobách. Testovací organismy pro vodní prostředí zahrnují bakterie, bezobratlí (vířníci, žábronožky, perloočky, měkkýši), ryby, řasy a vodní rostliny (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

### 2.1.2 Bioindikační metody

Bioindikace je metoda, která na základě chování a vlastností živého systému usuzuje na vlastnosti toxikantů v přirozeném prostředí. Součástí tohoto přístupu jsou ekotoxikologické testy. Počet bioindikačních metod stále narůstá a provedení se neustále zdokonaluje (ANDĚL, 2011).

Mezi hlavní bioindikační metody v suchozemském ekosystému patří houby (lišejníky, mechorosty, mikorhizické houby), nahosemenné rostliny (smrk ztepilý, borovice lesní), krytosemenné rostliny (lípa srdčitá, petunie, růstové testy rostlin, apod.), živočichové (hlístice), kroužkovci (žížala hnojní, roupice *Enchytraeus crypticus*), členovci (chvostoskok *Folsomia candida*, pavouci, včela medonosná, moucha podzimní, octomilka

obecná, zlatohlávek tmavý, apod.), měkkýši (hlemýžď kropenatý), obratlovci (plazi, ptáci, vejce ptáků, apod.) a savci (potkan laboratorní, hraboš polní) (ANDĚL, 2011).

Mezi bioindikační metody ve vodním ekosystému patří rostliny (řasy sladkovodní, řasy mořské, okřehek, apod.), mikrobi (*Vibrio fischeri*), prvoci (obrvenky), žahavci (nezmaři), vířníci, členovci (perloočky, žábronožky, беруška vodní, pakomáři, apod.), kroužkovci (nitěnky), měkkýši, obratlovci (živorodka duhová, pstruh duhový, obojživelníci, vodní ptáci, drápatka vodní, apod.) (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

### 2.1.3 Klasické, standardní testy

- Test akutní toxicity na bakterii *Vibrio fischeri*
- Test akutní toxicity na vodním obratlovci *Poecilia reticulata*
- Test akutní toxicity na vodním členovci *Daphnia magna*
- Test inhibice růstu na chlorokokální řase *Desmodesmus*
- Test inhibice růstu na kořenech rostlin *Sinapis alba*

(Vscht[online], 2010).

### 2.1.4 Mikrobiotesty

Tyto testy jsou charakteristické miniaturizací, zkrácenou dobou inkubace, možností alternací při vyhodnocování a řízenou produkcí klidových stádií.

Používají se akvatické testy, kdy se pracuje s vodnými výluhy. Mnohé z nebezpečných látek však mají nízkou rozpustnost, mohou být hydrofobní, apod. Je zde proto možnost kontaktního terestriálního testu. Mezi organismy pro kontaktní testy lze zařadit:

- Reprodukční test na chvostoskoku *Folsomia candida*
- Reprodukční test na roupici *Enchytraeus crypticus*
- Test inhibice růstu kořene *Lactuca sativa*
- Test na luminiscenční bakterii *Vibrio fischeri*
- Imobilizační test na *Daphniích*
- Růstový inhibiční test na řasách (Vscht[online], 2010).

### 2.1.5 Biosenzory, biosondy

Tato metoda využívá průtokoměr a detekci na řasách, na rybách nebo na korýších (Vscht[online], 2010).

### 2.1.6 Specifické testy toxicity

- Test efektů na mortalitu, reprodukci a růst žížaly *Eisenia fetida*
- Bioakumulační test se žížalou *Eisenia fetida* a roupicí *Enchytraeus albidus*
- Test efektů na mortalitu, reprodukci a růst roupic *Enchytraeus albidus* a *Enchytraeus crypticus*
- Test efektů na mortalitu a reprodukci chvostoskoků *Folsomia candida* a *Folsomia fimetaria*
- Test efektů na mortalitu *Caenorhabditis elegans*
- Test na klíčivost, vzcházení a růst vyšších rostlin (např. *Avena sativa* a *Brassicca rapa*)

(Vscht[online], 2010).



### 3 TĚŽKÉ KOVY V PŮDÁCH A JEJICH VLIV NA EKOTOXICITU

Škodlivé látky v prostředí mohou být prvky, sloučeniny nebo směsi. Tyto látky jsou svým původem, podstatou, množstvím, místem vzniku pro dané prostředí a organismy v něm žijící, cizorodé. Co se týká kontaktu škodlivé látky s živým organismem, půda a sedimenty jsou považovány za médium pomalé nebo za dlouhodobé rezervoáry mnoha škodlivin, oproti ovzduší, které je velmi dynamické. Je pravdou, že znečištění jedné složky prostředí má za následek znečištění i jiných složek. Mezi hlavní škodlivé látky, které mohou mít vliv na ekotoxicitu, patří rizikové prvky jako je As, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Ti, V a Zn. Pokud se tyto těžké kovy dostanou do půdy, mohou následně proniknout do potravního řetězce organismů a narušit tak rovnováhu ekosystémů. Kovy se do půdy nejčastěji dostávají v oblastech průmyslových center, z používání průmyslových hnojiv, fungicidních přípravků či z automobilové dopravy (PROKEŠ et al., 2005).

Největší imisní zatížení půdních organismů lze pozorovat v povrchových vrstvách půdy, kde je předpoklad kontaktu s polutanty, dále pak v humózních organických horizontech, kde je kumulace kontaminantů nejvyšší. Následně dochází k toxickým vlivům na půdní mikroorganismy, čímž se ovlivňují nejen půdní procesy, ale celý lesní ekosystém (ANDĚL, 2011).

Existuje mnoho metod, jak zjistit míru toxicity, ale mnohé z metod jsou časově náročné a drahé. Jako alternativa byla navržena chemická metoda napodobující biologickou odpověď – *Vibrio Fischeri* (AN, 2012). Definice biologické dostupnosti není jednotná. Z hlediska ochrany ŽP je to termín označen jako „bioaccessibility“ -> podíl, který je potenciálně k dispozici (desorpci) pro biotu v půdách (ČVANČAROVÁ, 2013).

Mezi nejčastější vlivy těžkých kovů na ekotoxicitu půd patří:

- Změna metabolismu mikroorganismů
- Narušení humifikačních procesů
- Narušení potravního řetězce
- Rozmnožování nežádoucích druhů či jejich přemnožení
- Poškození organismu
- Ztráta živin a úrodnosti
- Změny ve složení společenstva (ŠUDOMA, 2013).

### 3.1 Rizikové prvky a mikroorganismy

Rizikové prvky v půdních ekosystémech významně ovlivňují mikroorganismy. Ty se podílejí na změně rozpustnosti, mobility a biodostupnosti rizikových prvků. Mobilizace a imobilizace je uskutečňována následujícími mechanismy:

1. oxidace,
2. změny pH,
3. rozpouštění a extrakce rizikových prvků mikrobiálními metabolity,
4. imobilizace, která vede k vytváření stabilních materiálů,
5. bioakumulace organickou hmotou,
6. transformace organokovových komplexů

(PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

Biodostupnost rizikových prvků souvisí zejména s formou výskytu v půdách. Jestliže jsou vázány v silikátové matici, je malá pravděpodobnost, že se uvolní a ovlivní ekotoxicitu. Biodostupnost, resp. ekotoxicita je tedy závislá na vodou vyloužitelné frakci (rozhovor s prof. Ing. Raclavskou, CSc., Ostrava, březen 2015).

Příjem a kumulaci kovů lze rozdělit do dvou částí. U mrtvých buněk dochází k adsorpci na buněčnou stěnu nebo jiné vnější povrchy. Toho procesu se účastní ligandy, které jsou součástí buněčné stěny. Druhá část je na metabolismu závislá a dochází k transportu rizikových prvků přes buněčnou stěnu. Buněčná stěna bakterií obsahuje lipidy, proteiny, polysacharidy a má elektronegativní náboj. Proto silně reaguje s kovovými ionty z vnějšího prostředí (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

## 4 FORMY VÝSKYTU KOVŮ A METALOIDŮ V PŮDÁCH

Rizikové prvky, které pocházejí z činností člověka, lze zařadit mezi nejdéle a nejčastěji působící kontaminanty v životním prostředí. Tyto prvky přetrvávají v půdách tisíce let a je velmi obtížné eliminovat jejich dostupnost pro živé organismy. Obsahy rizikových prvků často převyšují své limity a tak mohou mít negativní účinky na fyzikálně–chemické procesy, biologické procesy v půdě a mohou se dostat do potravního řetězce. Tyto toxické látky se v ekosystémech pohybují specifickými cestami biologických cyklů. Z cyklů mohou vystoupit a kumulovat se tak v půdě nebo živém organismu. **Mobilitu ovlivňuje především rozpustnost sloučenin, která je vyšší, čím je sloučenina rozpustnější. Mobilita a zároveň toxické působení je závislé na hodnotách pH** (PAVLÍKOVÁ et al., 2009; PITTER 2009).

Jedná se o škodliviny, které prokazatelně negativně ovlivňují rostlinné a živočišné organismy. Mezi hlavní zdroje rizikových prvků patří průmyslová hnojiva, průmyslová činnost, spalování fosilních paliv či doprava. Následně se tyto látky dostávají do vod, ovzduší a půdy, což má za následek narušení funkce přírodních ekosystémů (ŠPUNDA, 2001). Tyto prvky mají za následek nejrůznější půdotvorné a biochemické procesy (ALLOWAY, 1995). V nízkých koncentracích jsou tyto prvky součástí zemské kůry a v životním prostředí se vyskytují ve formě ryzí nebo ve formě solí. Sloučeniny se vyskytují ve všech skupenstvích. Migrace rizikových prvků se uskutečňuje přírodně nebo díky antropogenní činnosti, přičemž antropogenní šíření roste velmi rychle. Jedná se o velmi kumulativní škodliviny, jelikož na rozdíl od organických látek nikdy nedegradují (KRIŠTOFOVÁ, 2005). Ekotoxikologie upřednostňuje pro kovy škodlivé životnímu prostředí označení těžké kovy. Do této skupiny patří Cu, Zn, Cd, Hg, Pb, Cr, Ni, Mn a Fe (PAVLÍKOVÁ et al., 2009). Jedná se o kovy, se specifickou atomovou hmotností, která je větší než  $4,5 \text{ g.cm}^{-3}$ . Tyto prvky jsou známé svými toxickými účinky na organismus. Za těžké kovy se často nesprávně označují i tzv. metaloidy, což jsou polokovy (Se, As), které mají však také toxické vlastnosti (PROKEŠ et al., 2005). Allowey (1990) a Adriano (2001) řadí mezi nebezpečné prvky pro životní prostředí především As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb a Zn a zavedli termín rizikové prvky (PAVLÍKOVÁ et al., 2009).

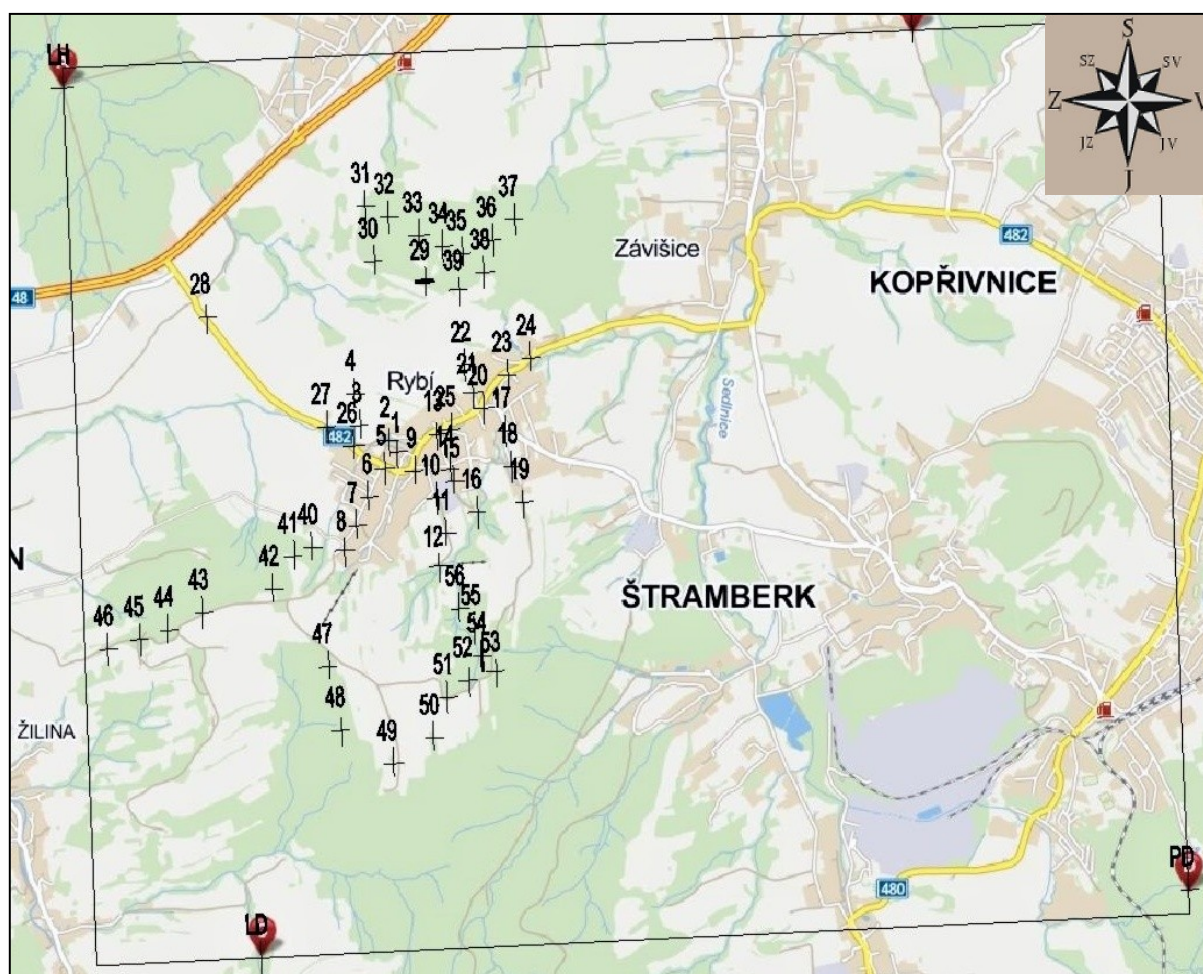
Z výsledků bakalářské práce vyplývá, že koncentrace rizikových prvků v lesních půdách obce Rybí ovlivňuje výskyt těšinitů v podloží. V horninách těšinitové asociace se vyskytují vyšší obsahy Cr, Co, Ti, Ba, Ni, atd. Vysoký obsah Cr, Ti a závislost mezi Cr – Fe – Ti potvrzují přítomnost pikritických hornin v podloží. Zvýšený a přirozený výskyt těchto prvků vylučuje antropogenní kontaminaci.

V půdách intravilánu obce jsou zvýšené koncentrace olova a zinku. Příčinou může tedy být doprava, protože olovo se uvolňuje z brzdového obložení. Díky hloubkovému odběru bylo zjištěno, že výskyt olova nesouvisí s charakterem podložních hornin. Zvýšené koncentrace zinku byly zjištěny v povrchovém horizontu. Tento prvek poskytuje statisticky významné korelační závislosti s vápníkem, a proto lze předpokládat, že jeho zvýšený výskyt souvisí s charakterem podložních hornin – zvýšený výskyt ve vápencích (HRYNYŠINOVÁ, 2013).

V následující tabulce č. 2 jsou uvedeny naměřené obsahy rizikových prvků v půdách zájmové oblasti a na obrázku č. 1 lze vidět vzorkovací síť vymezeného území.

	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Zr	Pb	Bi
	Intravilární půdy bez těšinitové asociace														
průměr	17538	4785	81	125	772	35133	182	36	141	13	82	139	179	40	8
	Intravilární půdy ovlivněny těšinity														
průměr	15247	9454	129	262	1611	55387	215	40	121	11	56	118	184	28	8
	Lesní půdy bez těšinitové asociace														
průměr	3048	3200	54	89	998	17044	108	23	93	18	53	51	149	96	7
	Lesní půdy ovlivněny těšinity														
průměr	8992	11864	163	297	1812	56697	257	34	162	20	57	86	165	50	8

Tabulka 2: Hodnoty aritmetického průměru (geochemické pozadí) vybraných rizikových prvků v půdách oblasti Rybí (mg/kg), oranžově vyznačeny vyšší obsahy prvků těšinitové asociace (HRYNYŠINOVÁ, 2013)



Obrázek 1: Vzorkovací síť vymezeného území, v měřítku 1:80 000 (HRYNYŠINOVÁ, 2013)

## 5 REPRODUKČNÍ TEST NA CHVOSTOSKOKU *FOLSOMIA CANDIDA*

Chvostoskok (*Folsomia candida*) - jedná se o drobného živočicha (viz. obrázek. č.1), patřící do skupiny členovců a dosahující přibližně 1 mm. Živí se především bakteriemi nebo odumřelou organickou hmotou. Z tohoto důvodu se podílí na tvorbě základních půdních funkcí, zejména na rozkladu organického materiálu. Obecně platí, že tento druh je citlivější na suchou půdu. Změny vlhkosti mohou vést k odlišným reakcím na chemické látky. Teplota a obsah vody v půdě jsou faktory, které ovlivňují existenci populací a jejich distribuci (BANDOW, 2014).



Obrázek 2: *Folsomia candida* (zdroj: [www.enfo.agt.bme.hu](http://www.enfo.agt.bme.hu))

Použití testu je zakotveno v mezinárodní normě ISO 11267 - Soil quality – Inhibition of reproduction of Collembola (*Folsomia candida*) by soil pollutants. Českou verzí je norma ČSN ISO 11267 (836451) – Kvalita půdy – Inhibice reprodukce chvostoskoka. Inhibice *Folsomia candida* látkami znečišťujícími půdu (PJŮROVÁ et al., 2014).

Tento biotest je značně používán, jelikož poskytuje informace o vlivu koncentrace kovů v biologicky dostupné formě na inhibici *Folsomia candida*. Stanovení celkové koncentrace kovů v půdě není dostačující, protože kovy mohou být ve formě, která není organismem absorbovatelná (MELI et al., 2013).

## 5.1 Podmínky biotestu

Test se používá na půdy a půdní materiály o neznámé kvalitě (např. kontaminované plochy, úprava půdy, apod.). Podstatou tohoto biotestu je testování vlivu chemických látek na reprodukci chvostoskoků v půdě. Laboratorní testy toxicity s *Folsomia candida* potřebují stálou kultivaci kultur. Organismy se chovají v plastových nádobách s víčkem. Chovný substrát se skládá ze směsi sádry a aktivního uhlí spolu s destilovanou vodou. Aktivní uhlí absorbuje plyny a exkrementy vyloučené chvostoskoky. Uhlík svým zbarvením napomáhá rozpoznat chvostokoka bílého zbarvení na tmavém pozadí. Důležité je, udržovat správnou vlhkost substrátu. Přidává se menší množství demineralizované vody tak, aby byl neustále nasycený, jinak hrozí úhyn vysušením. Je vhodné udržovat teplotní podmínky při teplotě 20 °C v místnosti se stálou teplotou. Při testování se používají 10 až 12–ti denní jedinci. Chvostokoci se krmí sušenými pivovarskými kvasnicemi, a to 1 – 2 krát týdně (PJŮROVÁ et al, 2014, DOŠKÁŘOVÁ, 2012).

## 5.2 Průběh biotestu

Do nádoby se substrátem se vloží několik dospělých samiček (20 – 30 jedinců), přičemž na substrát se položí několik miligramů zmíněného suchého droždí. Přenesení samiček na substrát vyvolá kladení vajíček. Po 2 dnech se dospělci odstraní a v kultivační nádobě zůstávají jen vajíčka. Asi po 10 – 14 dnech od založení chovu se začnou líhnout první juvenilové. Do testu se použijí juvenilní jedinci staří 10 – 12 dní (DOŠKÁŘOVÁ, 2012). Sleduje se mortalita dospělých jedinců a reprodukce prostřednictvím počtu nově vylíhnutých jedinců (PJŮROVÁ et al, 2014).

## 5.3 Výsledky biotestu

**Pro půdy, ze zájmové oblasti Rybí u Nového Jičína, kde byl vysoký obsah Cr, Ni, Zn apod., byl vybrán reprodukční test na chvostokoku *Folsomia candida*.**

Výsledky sledování inhibice *Folsomia candida* jsou uvedeny v publikaci Pjůrové B., Matýska D., Drozdové J., Hrynyšinové E.: Ecotoxicological Assessment of Soils Formed by Weathering of Igneous Rocks of Teschenite-Picrite Association (Beskydy Mountains, Czech Republic), která je v příloze diplomové práce.



Hornina	Výsledky	Ca	Fe	Ti	Cr	Cu	Ni	Ba	Zn
		(mg/kg)							
Lesní půdy	Hodnota pozadí	11200	34200	6200	165	23	54	LOD	111
	Prahová hodnota	40200	73300	14000	631	42	85	LOD	224
Lesní půdy	Testovaný vzorek	14500	55700	9500	393	22	LOD	LOD	218

Tabulka 3: Obsah prvků v lesní půdě a ve vzorku testovaném na ekotoxicitu chvostoskoka (PJŮROVÁ et al., 2014)

Z informací uvedených v publikaci vyplývá, že hodnota pH je nejdůležitějším faktorem, který ovlivňuje toxicitu. Kyselé pH může mít vliv na organismy nejen přímo, ale také to může vést k vysoké dostupnosti rizikových prvků. Čím nižší je hodnota pH, tím vyšší je pravděpodobnost negativního dopadu na reprodukci *Folsomia candida*.

Expozice 10 až 12–ti denních jedinců v půdě trvala 28 dní při teplotě 20 °C a ve tmě. Dospělí a novorozenci byli počítáni pomocí softwarového programu ImageJ v1.43 (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

Půdy vyvinuté zvětráváním hornin z asociace těšinitů nevykazují inhibiční účinek na *Folsomia candida*. Úmrtnost dospělých jedinců nepřesáhla 20 %. Nejvyšší koncentrace geochemického pozadí vykazuje Cr, Ni a Zn a to v pikritech, což souvisí s přítomností olivínu v pyroxenu. Inhibice při koncentraci 400 mg/kg Cr rovněž nebyla prokázána. Vysoké koncentrace Cr v půdách jsou ovlivněny přítomností chromspinelu, který je stabilní a odolný vůči zvětrávání, není uvolňován do životního prostředí.

Následující tabulka č. 4 zobrazuje koncentrace prvků v půdách zájmové oblasti, které nezpůsobily inhibici u *Folsomia candida*.

	Ca	Ti	V	Cr	Mn	Fe	Co	Cu	Zn	As	Rb	Sr	Zr	Pb	Bi
	Intravilární půdy bez těšinitové asociace														
průměr	17538	4785	81	125	772	35133	182	36	141	13	82	139	179	40	8
	Intravilární půdy ovlivněny těšinity														
průměr	15247	9454	129	262	1611	55387	215	40	121	11	56	118	184	28	8
	Lesní půdy bez těšinitové asociace														
průměr	3048	3200	54	89	998	17044	108	23	93	18	53	51	149	96	7
	Lesní půdy ovlivněny těšinity														
průměr	8992	11864	163	297	1812	56697	257	34	162	20	57	86	165	50	8

Tabulka 4: Chemismus půd v zájmové oblasti Rybí u Nového Jičína (HRYNYŠÍNOVÁ, 2013)



## **6 CHARAKTERISTIKA VODNÉHO VÝLUHU Z PŮD A PŮDNÍ SUSPENZE**

### **Vodný výluh**

Příprava vodného výluhu probíhala podle požadavků vyhlášky č. 294/2005 Sb. o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady.

Výluh byl připraven z půd o zrnitostním složení pod 2 mm, částice půdního skeletu (nadsítené) byly odstraněny. Vyluhovací médium bylo připraveno v poměru 1:10. Poté se roztok půdy luhoval na třepacím zařízení po dobu 24 hodin a následně došlo k filtraci. Měření pH a vodivosti vodného výluhu probíhalo ihned po filtraci.

### **Suspenze**

Čerstvá suspenze byla připravena navážením zeminy a následným smísením s demineralizovanou vodou a to v poměru 2:10. V případě suspenze byl přidán stanovený obsah NaCl. Čerstvá suspenze nebyla podrobena třepacímu zařízení ani filtraci. Měření pH a vodivosti suspenze bylo provedeno ihned po přípravě.

## 7 VÝSLEDKY A VYHODNOCENÍ

V následujících tabulkách č. 5 a č. 6 jsou uvedeny výsledky hodnot pH, vodivosti a inhibice pro vodný výluh a čerstvou suspenzi. Oranžovou barvou jsou vyznačeny inhibice < 30 (limitní hodnota definovaná pro akvatické organizmy ve vyhlášce č. 294/2005 Sb.)

VODNÝ VÝLUH							
Půdy intravilánu				Lesní půdy			
Vzorek č.	pH	Vodivost (μS/cm)	Inhibice (%)	Vzorek č.	pH	Vodivost (μS/cm)	Inhibice (%)
1.	7,85	273	28,40	29.	5,77	134	33,33
2.	6,91	79	55,05	30.	6,09	107	37,34
3.	6,82	63	62,37	31.	7,32	405	47,02
4.	7,14	160	63,63	32.	7,85	555	18,76
5.	7,92	173	70,23	33.	7,21	289	30,63
6.	7,67	253	69,78	34.	7,58	425	40,71
7.	6,84	68	73,64	35.	4,06	280	59,13
8.	7,85	397	56,71	36.	4,8	181	44,60
9.	7,86	186	30,34	37.	4,61	174	47,96
10.	7,84	381	54,22	38.	4,98	151	31,12
11.	8,1	358	64,23	39.	5,26	135	53,70
12.	7,59	109	44,01	40.	5,41	135	52,53
13.	7,9	190	11,56	41.	4,65	109	32,00
14.	6,26	128	26,68	42.	4,95	143	33,72
15.	7,99	269	14,09	43.	6,57	144	38,15
16.	6,71	109	68,60	44.	6,61	122	60,03
17.	7,92	226	18,66	45.	6,05	82	25,45
18.	7,86	234	38,92	46.	6,62	128	22,68
19.	6,82	73	37,71	47.	6,18	78	14,72
20.	7,76	276	30,60	48.	4,5	224	49,39
21.	7,81	288	40,72	49.	3,96	238	39,76
22.	6,63	68	39,90	50.	5,72	113	8,19
23.	7,6	328	68,13	51.	3,91	207	41,88
24.	7,77	318	35,76	52.	4,46	148	54,48
25.	6,52	58	44,36	53.	4,42	148	34,92
26.	7,54	355	29,39	54.	4,51	120	64,63
27.	7,23	247	29,70	55.	4,45	198	54,36
28.	7,65	250	43,50	56.	4,89	113	52,33
Ar. průměr	7,44	211		Ar. průměr	5,48	189	
St. odchylka	0,54	107		St. odchylka	1,16	112	
Medián	7,66	230		Medián	5,12	146	

Tabulka 5: Výsledky pH, vodivosti a inhibice pro vodný výluh

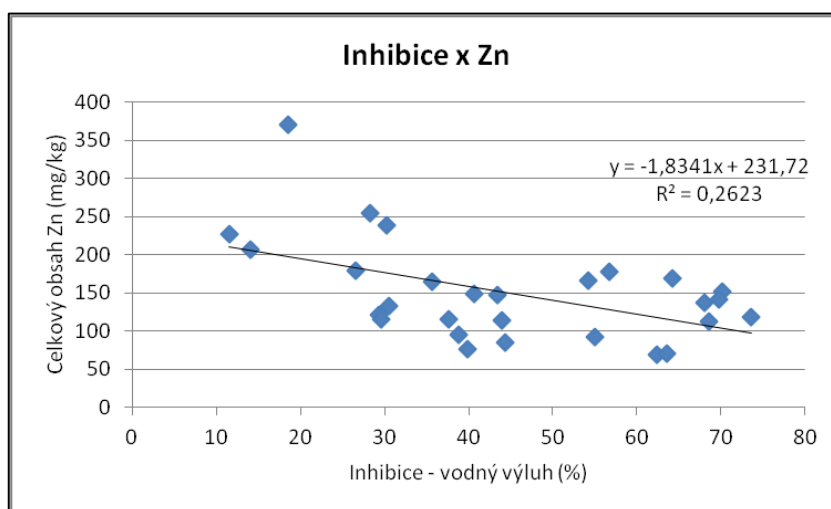
SUSPENZE							
Půdy intravilánu			Inhibice (%)	Lesní půdy			
Vzorek č.	pH	Vodivost (mS/cm)		Vzorek č.	pH	Vodivost (mS/cm)	Inhibice (%)
1.	5,66	33,1	42,83	29.	4,35	33,4	56,90
2.	4,44	32,9	88,59	30.	4,70	34,3	69,86
3.	4,62	25,8	67,63	31.	6,74	36,6	17,52
4.	5,83	32,9	50,40	32.	6,78	36,7	50,05
5.	6,46	30,3	38,44	33.	5,64	36,9	11,42
6.	6,52	31,1	17,80	34.	6,38	37,1	10,83
7.	5,23	33,1	61,26	35.	3,11	35,7	89,52
8.	6,47	25,9	34,84	36.	3,80	36,1	84,19
9.	6,53	34,4	87,29	37.	3,26	36,1	82,76
10.	7,12	26,4	34,85	38.	3,95	34,3	43,91
11.	6,8	35,8	80,82	39.	4,18	36,0	41,57
12.	5,73	36,3	39,15	40.	4,60	35,8	49,09
13.	6,72	36,1	77,13	41.	3,61	32,9	75,80
14.	4,24	36,2	72,01	42.	4,07	35,2	64,46
15.	6,48	36,6	45,42	43.	5,41	36,1	45,63
16.	6,06	36,4	50,52	44.	5,24	36,5	56,91
17.	6,37	36,7	48,32	45.	4,28	36,6	72,11
18.	6,92	33,9	63,00	46.	5,29	35,7	39,69
19.	5,84	35,7	66,40	47.	4,21	32,8	54,31
20.	6,74	35,2	49,09	48.	3,78	34,5	68,47
21.	7,31	34,4	67,00	49.	3,11	30,3	81,60
22.	4,75	34,9	73,06	50.	4,75	35,4	42,31
23.	6,74	35,5	68,41	51.	3,09	36,1	89,81
24.	6,77	36,2	50,44	52.	3,41	35,2	67,21
25.	5,34	33,7	68,03	53.	3,46	27,7	95,63
26.	6,63	36,2	55,02	54.	3,54	36,3	66,01
27.	6,57	35,6	73,36	55.	3,53	33,7	49,02
28.	7,25	33,6	62,43	56.	3,85	36,1	55,82
Ar. Průměr	6,15	33,8		Ar. Průměr	4,36	35	
St. Odchylka	0,86	3,18		St. Odchylka	1,07	2,10	
Medián	6,48	34,65		Medián	4,13	35,75	

Tabulka 6: Výsledky pH, vodivosti a inhibice pro suspenzi

## 7.1 Výsledky statistické analýzy - vodný výluh

V rámci sledování inhibice *Vibrio fischeri* v půdách odebraných v Rybí byla provedena korelační analýza mezi obsahem kovů v sušině (Fe, Mn, Cr, V, As, Zn, Pb, Cu) a hodnotou inhibice stanovené ve vodném výluhu a v suspenzi. Statisticky významnou závislost se podařilo zjistit pouze mezi obsahem Zn v půdách intravilánu a inhibicí půd (graf č. 1), kde hodnota koeficientu korelace ( $r = 0,51$ ) je vyšší než kritická hodnota koeficientu korelace při hladině významnosti 0,05. Ze závislosti vyplývá, že Zn má úlohu biogenního prvku, neboť s klesající koncentrací vzrůstá inhibice.

Hodnoty celkových obsahů kovů jsou uvedeny v mé bakalářské práci (Výskyt těžkých kovů v půdách v oblasti Rybí u Nového Jičína).



Graf 1: Závislost inhibice ve vodném výluhu na celkovém obsahu Zn

Koeficient korelace mezi obsahem kovů a inhibicí *Vibrio fischeri* ve vodném výluhu byl sledován i pro lesní půdy, které jsou vyvinuty na těšínitových horninách. V tomto případě nebyla zjištěna žádná statisticky významná hodnota koeficientu korelace.

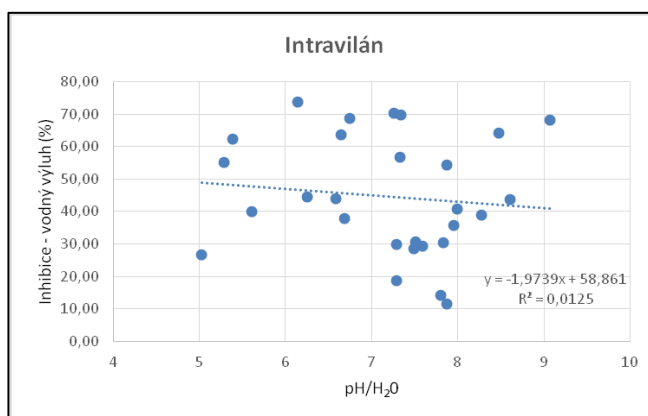
### Vliv pH půd na inhibici *Vibrio fischeri*

Mezi nejdůležitější faktor, který ovlivňuje toxicitu, patří půdní reakce. Hodnota pH ovlivňuje nejen rozpustnost, ale také speciaci a přechod kovů z pevné do kapalně fáze. Kyselé pH ovlivňuje organismy a může navýšit dostupnost Fe, Al a rizikových prvků. Dle studií bylo dokázáno, že absorpce kationtů (např. Cu, Ni, Zn) je ovlivněna hodnotou pH,

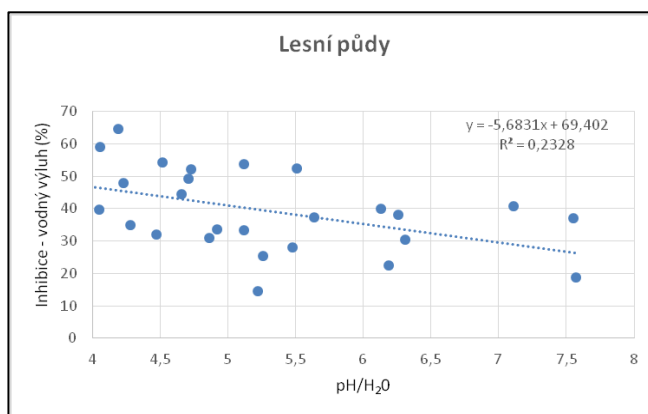
kationtovou výměnnou kapacitou, oxidy manganu, železem, obsahem jílových minerálů a obsahem organických látek (FROUZ ET AL., 2011).

Dle Scheerera et al. (2006) je optimální rozsah pH pro luminiscenci *V. fischeri*, v rozmezí 4,5 – 10,5. Tuto hypotézu potvrdila také Doškářová (2012), která ve své studii nepotvrdila závislost mezi pH a inhibicí v rozsahu pH 4 – 12. Podle Waters and Lloyd (1985) jsou nejvhodnější podmínky pro stanovení pH v okolí hodnot 6,8 v (ZECHNER, 2013).

V půdách intravilánu i v lesních půdách byl sledován vliv pH ( $H_2O$ ) na inhibici *Vibrio fischeri* (graf č. 2 a č. 3). V půdách intravilánu se pH pohybuje v rozmezí 5 – 9, z toho 76 % analyzovaných půd má pH v intervalu mezi 6 – 8, což reprezentuje převážně neutrální půdy. V lesních půdách je pH posunuto směrem do kyselější oblasti, 76 % vzorků má pH v rozmezí 4 – 6. Z uvedených výsledků je tedy zřejmé, že v neutrální oblasti nelze prokázat vliv pH na inhibici, zatímco v kyselém výluhu je pH klíčovým faktorem ovlivňujícím inhibici.



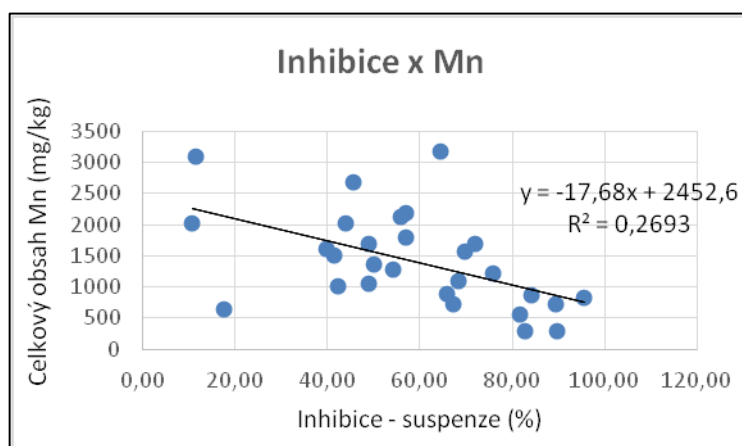
Graf 2: Závislost mezi inhibicí a pH ( $H_2O$ ) v rámci intravilánu obce pro vodný výluh



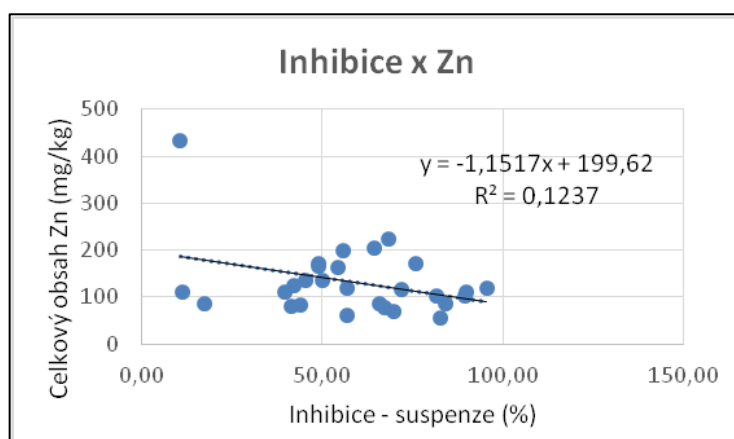
Graf 3: Závislost mezi inhibicí a pH ( $H_2O$ ) v rámci lesních půd pro vodný výluh

## 7.2 Výsledky statistické analýzy – suspenze

Stejně jako u vodného výluhu nebyla pro suspenzi půd z intravilánu obce Rybí prokázána statisticky významná závislost na obsahu kovů v sušině zemin. V tomto případě nebyla prokázána ani závislost mezi inhibicí *Vibrio fischeri* a obsahem Zn, která byla zjištěna u vodného výluhu. V lesních půdách byla prokázána statisticky významná hodnota koeficientu korelace mezi obsahem Mn a inhibicí ( $r = 0,52$ ), i v tomto případě Mn prokazuje spíše biogenní význam (graf č. 4). Podobnou závislost bylo možné sledovat i pro půdy intravilánu, ale hodnota koeficientu korelace (0,36) nesplnila podmínku kritické hodnoty koeficientu korelace ani na hladině významnosti 0,025. Podobné výsledky byly zjištěny i pro Zn ( $r = 0,35$ ).



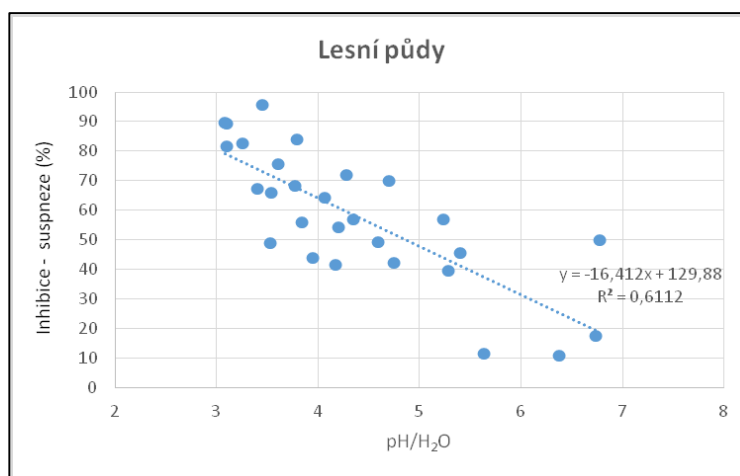
Graf 4: Závislost mezi inhibicí a celkovým obsahem Mn



Graf 5: Závislost mezi inhibicí a celkovým obsahem Zn

### Vliv pH na inhibici *Vibrio fischeri*

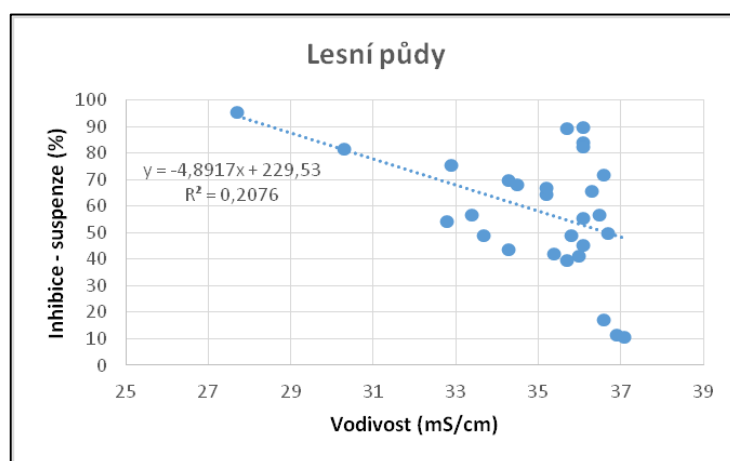
Stejně jako v předcházejícím případě při sledování závislosti mezi pH ve vodném výluhu a inhibicí *Vibrio fischeri* u půd intravilánu a lesních půd byl v suspenzi lesních půd prokázán, významný koeficient korelace ( $r = 0,78$ ), který splňuje podmínku kritické hodnoty korelace při hladině významnosti 0,005 (graf č. 6). Hodnota koeficientu korelace v suspenzi lesních půd je mezi pH a inhibicí *Vibrio fischeri* výrazně vyšší než pro vodný výluh. Pro půdy intravilánu nebyla prokázána statisticky významná závislost.



Graf 6: Závislost mezi inhibicí a pH (H<sub>2</sub>O) v rámci lesních půd pro suspenzi

### 7.3 Závislost mezi obsahem rozpuštěných látek vyjádřených jako vodivost a inhibicí (měřeno v suspenzi)

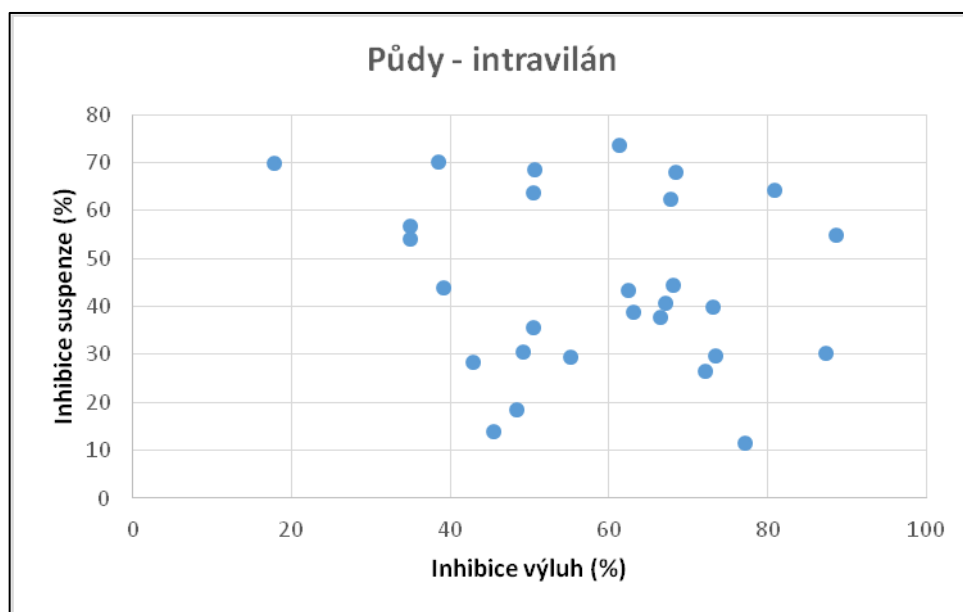
Vzhledem k tomu, že *Vibrio fischeri* jsou mořskými bakteriemi, lze předpokládat, že jejich optimální podmínky budou v prostředí s vyšší salinitou (obsahem rozpuštěných látek, vyjádřených konduktivitou). Konduktivita vodného výluhu se u obou souborů pohybuje přibližně ve stejném rozmezí 25 – 37 mS/cm. U vzorků lesních půd je zřejmá výrazná závislost poklesu inhibice s rostoucím obsahem rozpuštěných látek ( $r = 0,46$ ), je splněna kritická hodnota koeficientu korelace při hladině významnosti 0,01 (graf č. 7). Z uvedených výsledků je zřejmé, že v suspenzi z lesních půd musí být přítomny látky, které minimalizují inhibici a spíše bakterie aktivují (například dusík nebo fosfor).



Graf 7: Závislost mezi vodivostí a inhibicí v rámci lesních půd

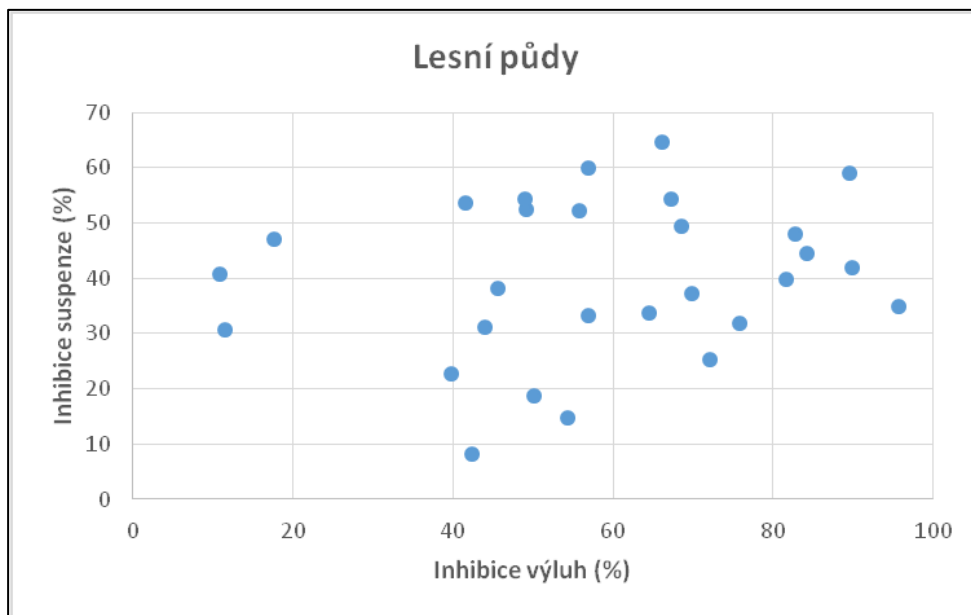
## 7.4 Srovnání inhibice *Vibrio fischeri* pro vodný výluh a suspenzi

V následujících grafech č. 8 a č. 9 byla sledována závislost mezi inhibicí ve vodném výluhu a inhibicí v suspenzi (%). Z pozice bodů vyplývá, že mezi oběma metodami není závislost, inhibice u *Vibrio fischeri* je ovlivněna rozdílnými faktory. Ze sloupcových grafů č. 10 a č. 11 vyplývá, že v suspenzi jsou hodnoty inhibice vyšší (u 21 vzorků lesních půd z 28 a u 19 vzorků půd v intravilánu obce z 28).

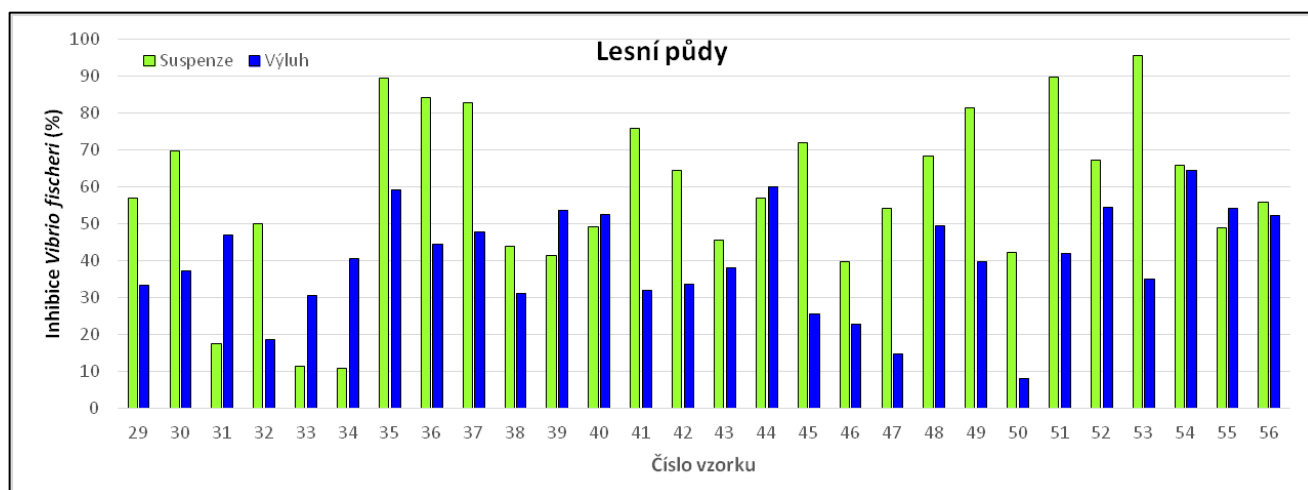


Graf 8: Srovnání výsledků inhibice ve výluhu a inhibice v suspenzi v rámci intravilánu obce.

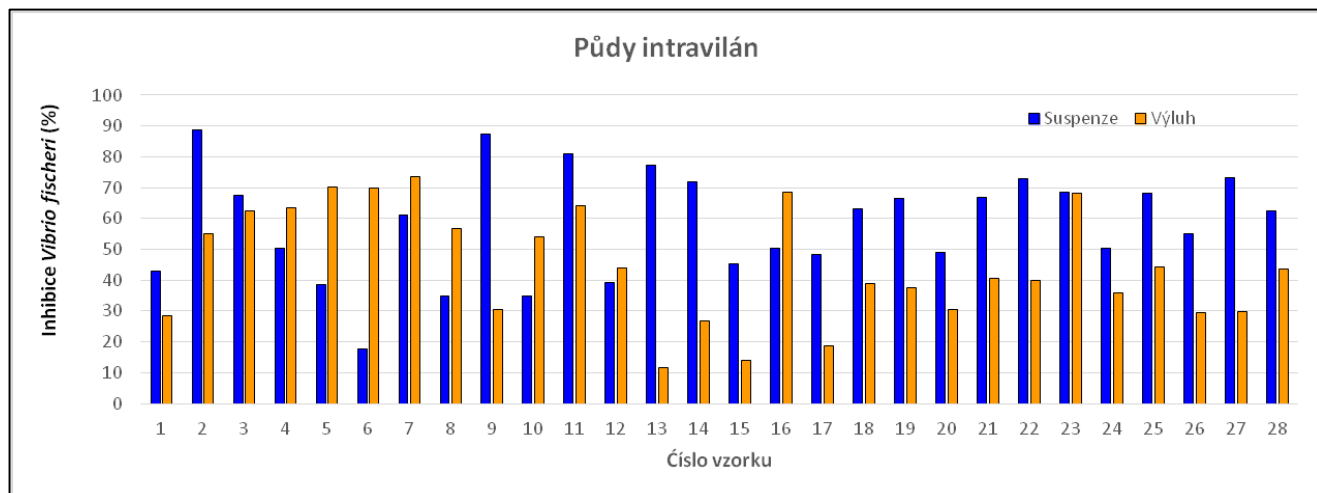




Graf 9: Srovnání výsledků inhibice ve výluhu a inhibice v suspenzi v rámci lesních půd



Graf 10: Srovnání výsledků inhibice ve výluhu a inhibice v suspenzi v rámci lesních půd



Graf 11: Srovnání výsledků inhibice ve výluhu a inhibice v suspenzi v rámci intravilánu obce

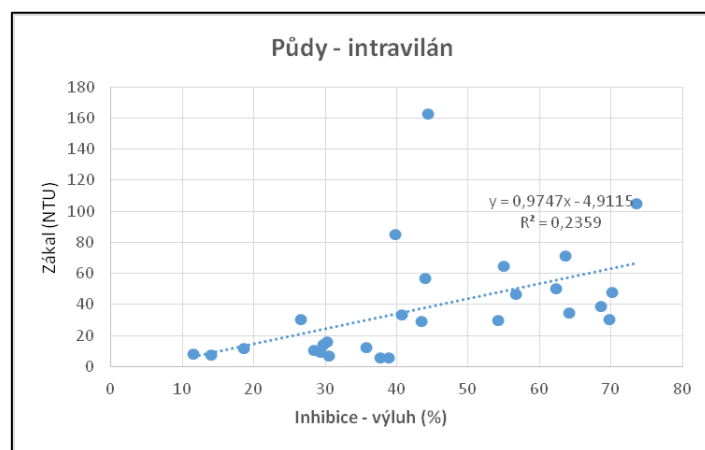
## 7.5 Výsledky zákalu a jeho závislost na inhibici

Stanovení zákalu bylo provedeno v laboratoři geologického institutu, dle ČSN ISO 7027 – Stanovení zákalu. V následující tabulce č. 7 jsou uvedeny hodnoty zákalu suspenze a výluhu pro vzorky z intravilánu obce. V grafu č. 12 je znázorněna statisticky významná závislost mezi zákalem a inhibicí pro vodný výluh z půd intravilánu ( $r = 0,49$ ), pro vzorky suspenze statisticky významná závislost nebyla prokázána. Podobná závislost byla zjištěna i pro lesní půdy (graf č. 13), kde v případě suspenze také nebyla prokázána statisticky významná závislost na inhibici, ale u vodného výluhu závislost prokázána byla ( $r = 0,61$ ).

Ve vodném výluhu byl stanoven ještě obsah fosforečnanů spektrofotometrickou metodou molybdenanem amonným (ČSN EN ISO 1189) a vodorozpustného draslíku pomocí elektrody (ČSN ISO 9964 – 3). Mezi fosforečnany a inhibicí *Vibrio fischeri* ve vodném výluhu nebyla prokázána statisticky významná závislost. Medián koncentrace fosforečnanů je 10,1 mg/kg sušiny pro půdy intravilánu a pro lesní půdy je medián výrazně vyšší 30,46 mg/kg sušiny.

Půdy - intravilán				
Vzorek č.	Inhibice/suspenze (%)	Zákal (NTU)	Inhibice/výluh (%)	Zákal (NTU)
1	42,83	3755,0	28,40	10,53
2	88,59	7434,7	55,05	64,51
3	67,63	7351,0	62,37	49,85
4	50,40	7637,0	63,63	70,92
5	38,44	5127,7	70,23	47,47
6	17,80	2849,3	69,78	30,35
7	61,26	7803,7	73,64	104,73
8	34,84	4402,3	56,71	46,74
9	87,29	3127,7	30,34	16,06
10	34,85	4644,3	54,22	29,45
11	80,82	2754,3	64,23	34,33
12	39,15	7742,0	44,01	56,93
13	77,13	5213,3	11,56	7,98
14	72,01	4985,0	26,68	30,27
15	45,42	2379,7	14,09	7,41
16	50,52	5617,0	68,60	38,73
17	48,32	2454,7	18,66	11,51
18	63,00	3027,3	38,92	5,51
19	66,40	6937,0	37,71	5,29
20	49,09	4439,0	30,60	6,50
21	67,00	5241,7	40,72	33,34
22	73,06	6715,0	39,90	85,05
23	68,41	5090,3		
24	50,44	6445,7	35,76	12,22
25	68,03	6236,7	44,36	162,73
26	55,02	3817,7	29,39	9,19
27	73,36	5327,0	29,70	13,73
28	62,43	4998,3	43,50	28,88

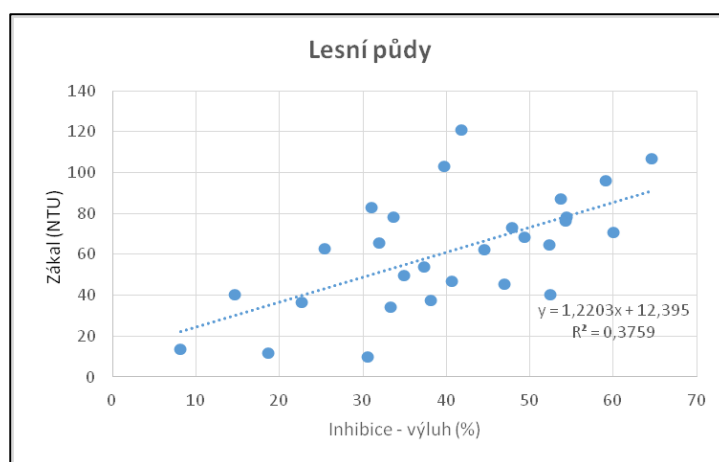
Tabulka 7: Hodnoty zákalu pro jednotlivé vzorky půdy v intravilánu



Graf 12: Závislost mezi inhibicí a zákalem ve vodném výluhu v rámci půd z intravilánu

Lesní půdy				
Vzorek č.	Inhibice/suspenze (%)	Zákal (NTU)	Inhibice/výluh (%)	Zákal (NTU)
29	56,90	3991,0	33,33	34,15
30	69,86	7047,3	37,34	53,89
31	17,52	5110,7	47,02	45,51
32	50,05	4599,7	18,76	11,62
33	11,42	5773,7	30,63	10,14
34	10,83	2751,7	40,71	46,72
35	89,52	1605,4	59,13	96,19
36	84,19	1778,5	44,60	62,48
37	82,76	2005,7	47,96	73,19
38	43,91	2595,7	31,12	82,90
39	41,57	5003,3	53,70	86,98
40	49,09	5749,3	52,53	40,17
41	75,80	5906,3	32,00	65,79
42	64,46	3868,7	33,72	78,32
43	45,63	4697,0	38,15	37,45
44	56,91	3402,7	60,03	70,93
45	72,11	6905,7	25,45	62,79
46	39,69	5223,3	22,68	36,71
47	54,31	5538,7	14,72	40,29
48	68,47	1819,3	49,39	68,30
49	81,60	2321,3	39,76	103,34
50	42,31	3802,7	8,19	13,47
51	89,81	7051,0	41,88	120,93
52	67,21	3246,7	54,48	78,48
53	95,63	1818,7	34,92	49,52
54	66,01	4053,3	64,63	106,80
55	49,02	1708,3	54,36	76,48
56	55,82	3096,0	52,33	64,59

Tabulka 8: Hodnoty zákalu pro jednotlivé vzorky lesní půdy



Graf 13: Závislost mezi inhibicí a zákalem ve vodném výluhu v rámci lesních půd

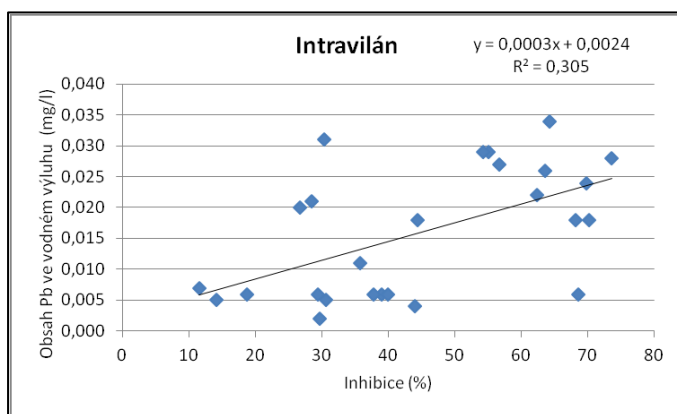
## 7.6 Obsah kovů ve vodném výluhu

Vyluhovatelnost byla ověřena rozbořem obsahu kovů ve vodném výluhu a to pro Cu, Fe, Pb a Zn (viz následující tabulka č. 9). Analýza byla provedena ve vodném výluhu metodou AAS (Hitachi) po okyselení vodného roztoku 2M HNO<sub>3</sub>. Vzorů s označením MD (mez detekce) znamenají, že naměřená hodnota byla pod mezí detekce.

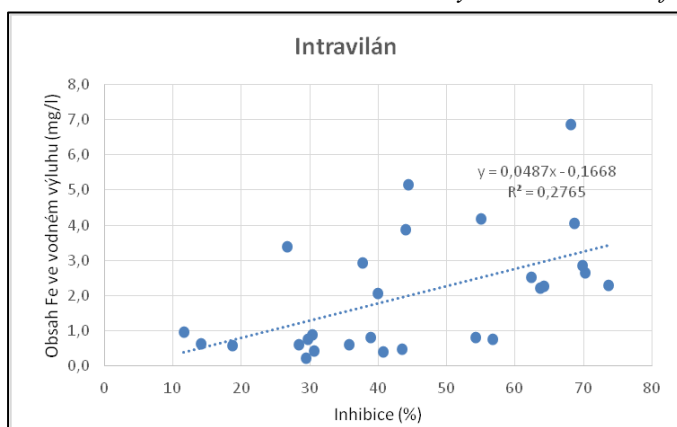
Vzorek č.	Cu	Fe	Pb	Zn	Vzorek č.	Cu	Fe	Pb	Zn
	(mg/l)					(mg/l)			
1	0,017	0,608	0,021	0,018	29	0,060	1,245	0,009	0,067
2	0,025	4,181	0,029	0,045	30	0,023	1,133	<0,001	0,028
3	0,018	2,519	0,022	0,024	31	0,016	0,225	0,011	0,006
4	0,014	2,211	0,026	0,022	32	0,029	0,230	0,011	0,010
5	0,013	2,647	0,018	0,023	33	0,025	0,746	0,009	0,045
6	0,017	2,850	0,024	0,019	34	0,025	0,220	0,012	0,048
7	0,036	2,296	0,028	0,022	35	0,041	2,430	0,040	0,090
8	0,037	0,747	0,027	0,013	36	0,030	2,011	0,029	0,058
9	0,013	0,883	0,031	0,012	37	0,024	1,915	0,024	0,044
10	0,023	0,807	0,029	0,009	38	0,019	1,304	0,013	0,051
11	0,023	2,262	0,034	0,018	39	0,017	1,435	0,012	0,048
12	0,028	3,871	0,004	0,014	40	0,030	3,592	0,017	0,047
13	0,020	0,969	0,007	0,010	41	0,026	2,929	0,013	0,047
14	0,046	3,375	0,020	MD	42	0,035	2,748	0,006	0,098
15	0,017	0,622	0,005	0,017	43	0,026	3,609	0,011	0,013
16	0,022	4,061	0,006	0,025	44	0,017	3,232	0,014	0,018
17	0,016	0,576	0,006	0,025	45	0,019	6,895	0,003	0,037
18	0,011	0,820	0,006	0,003	46	0,020	2,983	0,010	0,012
19	0,030	2,931	0,006	0,018	47	0,029	3,959	0,010	0,057
20	0,017	0,414	0,005	0,008	48	0,051	3,242	0,046	0,195
21	0,016	0,391	MD	0,003	49	0,043	5,116	0,036	0,151
22	0,029	2,072	0,006	0,019	50	0,022	2,033	0,015	0,058
23	0,080	6,870	0,018	0,065	51	0,038	2,983	0,029	0,098
24	0,018	0,612	0,011	0,005	52	0,023	2,359	0,015	0,061
25	0,023	5,148	0,018	0,025	53	0,036	2,748	0,025	0,071
26	0,014	0,209	0,006	0,002	54	0,020	3,802	0,021	0,048
27	0,017	0,764	0,002	0,003	55	0,029	4,665	0,022	0,085
28	0,009	0,486	MD	0,012	56	0,032	4,249	0,019	0,061

Tabulka 9: Rozbor obsahu kovů ve vodném výluhu

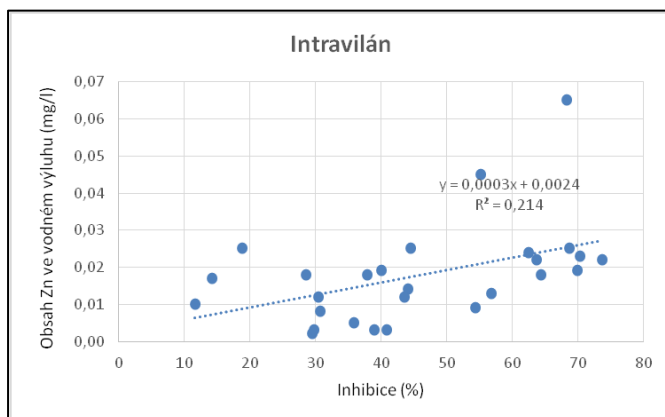
Byla provedena korelační analýza mezi obsahem kovů ve vodném výluhu a inhibicí *Vibrio fischeri*. Statisticky významnou korelační závislost se podařilo zjistit mezi obsahem Pb ( $r = 0,55$ ), Fe ( $r = 0,52$ ) ve vodném výluhu v půdách intravilánu a inhibicí *Vibrio fischeri*, kde hodnota koeficientu korelace splňuje kritickou hodnotu koeficientu korelace při hladině významnosti 0,005. Pro Zn ( $r = 0,47$ ) byla taktéž splněna kritická hodnota koeficientu korelace na hladině významnosti 0,01. Pro lesní půdy byla potvrzena statisticky významná korelační závislost pouze pro Pb ( $r = 0,43$ ) na hladině významnosti 0,025.



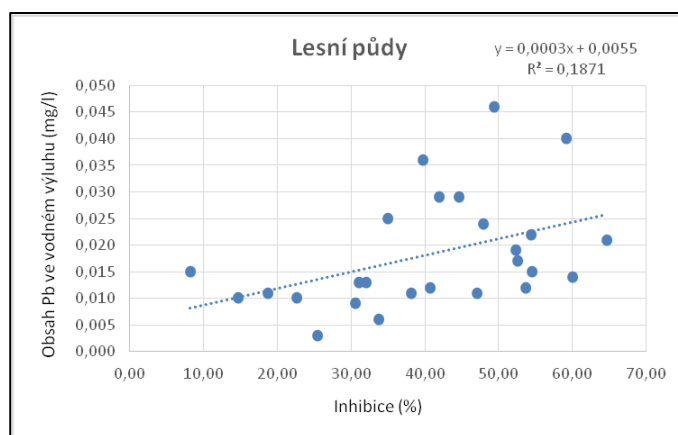
Graf 14: Závislost mezi obsahem Pb ve vodném výluhu a inhibicí *V. fischeri*



Graf 15: : Závislost mezi obsahem Fe ve vodném výluhu a inhibicí *V. fischeri*

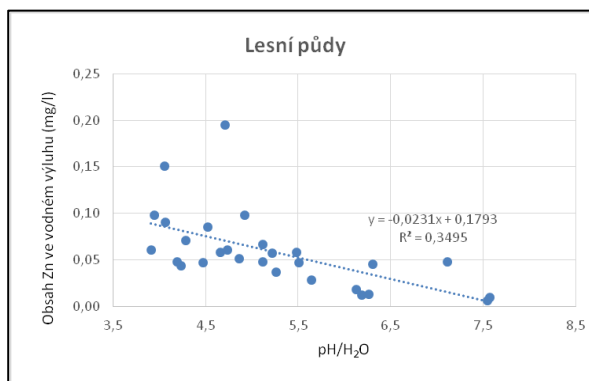


Graf 16: Závislost mezi obsahem Zn ve vodném výluhu a inhibicí *V. fischeri*

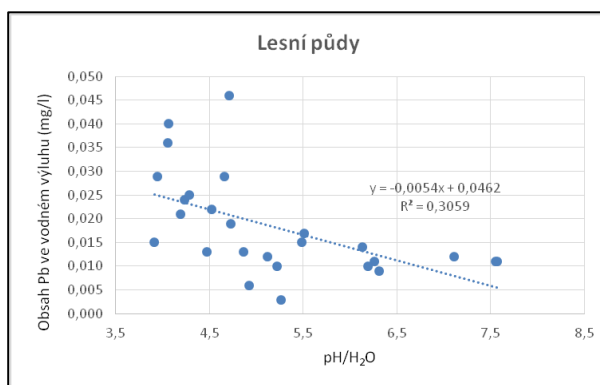


Graf 17: Závislost mezi obsahem Pb ve vodném výluhu a inhibicí *V. fischeri*

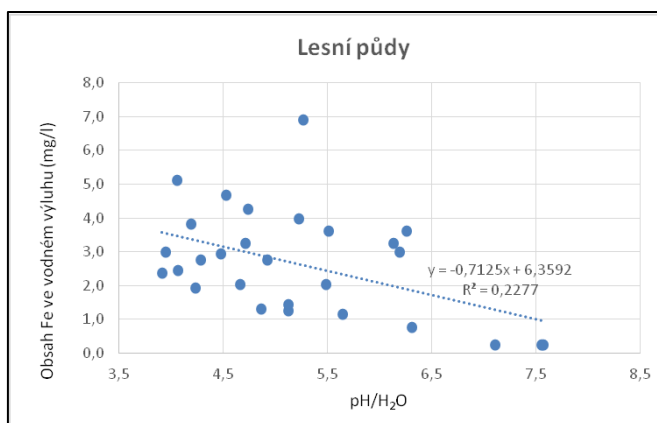
V následujících grafech je znázorněna statisticky významná závislost mezi pH ( $H_2O$ ) a obsahem prvku ve vodném výluhu. Významný koeficient korelace, který splňuje podmínku kritické hodnoty korelace při hladině významnosti 0,005, byl zjištěn pro Zn ( $r = 0,59$ ) a Pb ( $r = 0,55$ ). Další statisticky významnou korelační závislost vykazovalo Fe ( $r = 0,48$ ) při hladině významnosti 0,01 a Cu ( $r = 0,43$ ) při hladině významnosti 0,025. Pro vzorky intravilárních půd statisticky významná závislost nebyla prokázána.



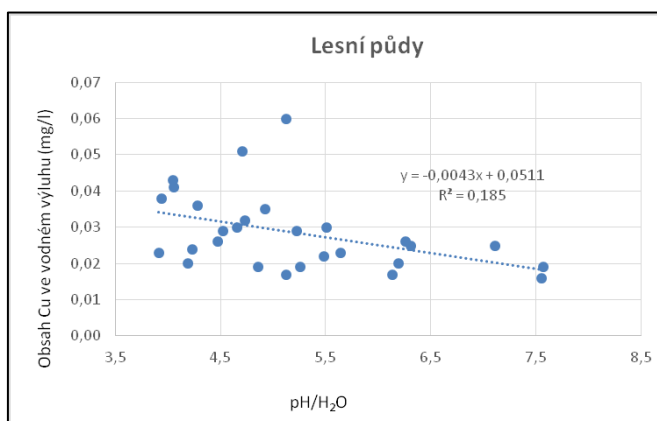
Graf 18: Závislost mezi obsahem Zn ve vodném výluhu a pH/ $H_2O$



Graf 19: Závislost mezi obsahem Pb ve vodném výluhu a pH/ $H_2O$

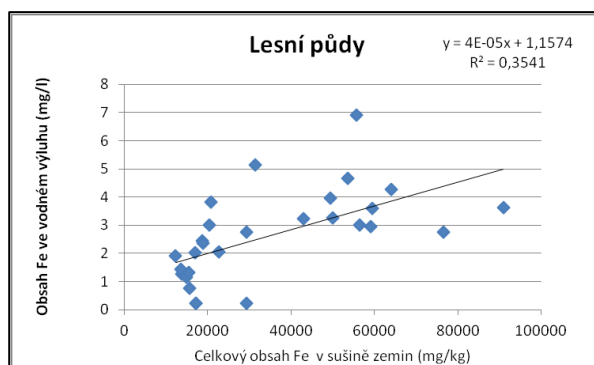


Graf 20: Závislost mezi obsahem Fe ve vodném výluhu a pH/H<sub>2</sub>O



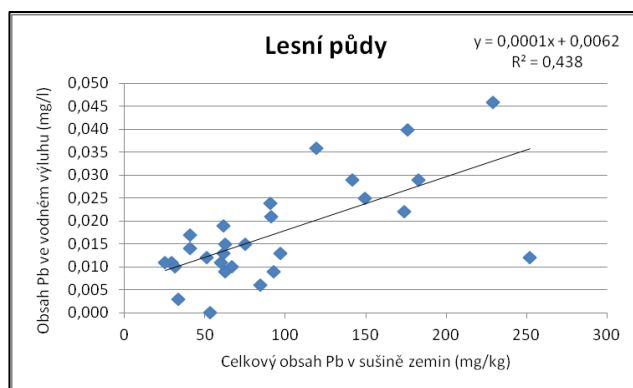
Graf 21: Závislost mezi obsahem Cu ve vodném výluhu a pH/H<sub>2</sub>O

Byla sledována závislost mezi celkovým obsahem prvku (data získána z mé bakalářské práce – Výskyt těžkých kovů v půdách v oblasti Rybí u Nového Jičína) a vyluhovatelností prvku. Půdy v intravilánu obce nevykazují žádnou statisticky významnou korelační závislost. Pro lesní půdy byl zjištěn významný koeficient korelace mezi celkovým obsahem Fe a obsahem Fe ve vodném výluhu ( $r = 0,60$ ) a pro Pb ( $r = 0,66$ ) při hladině významnosti 0,005.



Graf 22: Závislost mezi obsahem Fe ve vodném výluhu a celkovým obsahem Fe v sušině zemin





Graf 23: Závislost mezi obsahem Pb ve vodném výluhu a celkovým obsahem Pb v sušině zemin

## 7.7 Srovnání obsahů kovů ve vodném výluhu s doposud publikovanými hodnotami

Z naměřených výsledků inhibice *Vibrio fischeri* vyplývá, že obsahy rizikových prvků ve vodném výluhu jsou výrazně nižší než hodnoty publikované v odborné literatuře uváděné v tabulce č. 10.

	As	Cr	Cd	Cu	Ni	Pb	Zn	Mn	Fe	Hg	V
	(μg/l)										
Doškářová (2012)	6,3	17,64	0,99	227	26	64	860	1270	4210	0,30	12,24
TRV (1999)	190	180		60		2,5	120	80	1000	1	20
Fulladosa (2005)		11 - 700	110								
Kelly (2004)			6000	14000			2400				
Hrynyšinová (2015)				24		10,8	27		2225		

Tabulka 10: Průměrné koncentrace prvků ve vodném výluhu při inhibičním účinku do 30% na *V. fischeri* (DOŠKÁŘOVÁ, 2012; ZECHNER, 2013)

### Vysvětlivky:

TRV - Toxicity Reference Value for surface water, EPA 1999

Fulladosa E. et al. (2005)

Doškářová (2012) - maximální obsahy zjištěné v celém souboru při inhibici *Vibrio fischeri* < 30 %,.

Kelly et al. (2004)

Hrynyšinová (2015) – maximální obsahy zjištěné v celém souboru při inhibici *Vibrio fischeri* < 30 %,.

Z lineárních závislostí, které byly prokázány mezi obsahem Pb ve vodném výluhu a inhibicí *Vibrio fischeri* vyplývá, že 30 % inhibice způsobená Pb u půd z intravilánu nastává při koncentraci 11 µg/l, zatímco u lesních půd až při koncentraci vyšší 64 µg/l. 30 % inhibice *Vibrio fischeri* ve vodném výluhu půd z intravilánu byla u Fe zjištěna pro koncentraci 1,29 mg/l a pro zinek 33 µg/l.

## 8 ZÁVĚR

Cílem práce bylo stanovení toxického účinku vybraných rizikových prvků na bakterii *Vibrio fischeri* a chvostoskoka *Folsomia candida* a zjištění vlivu půdních parametrů na inhibici. Byly zjištěny následující poznatky:

- V půdách intravilánu nebyla prokázána závislost mezi inhibicí sledovanou u *Vibrio fischeri* a pH vodného výluhu. Nebyla prokázána ani závislost mezi obsahem rozpuštěných látek. Ze statistické analýzy vyplývá, že byla prokázána závislost mezi koncentrací Pb, Fe a Zn ve vodném výluhu a inhibicí sledovanou u *Vibrio fischeri*. Obsahy kovů jsou primárním faktorem ovlivňujícím inhibici u půd odebraných v intravilánu obce.
- U lesních půd je situace složitější. Statisticky nejvýznamnější závislost byla prokázána pro pH vodného výluhu a inhibicí sledovanou na *Vibrio fischeri*. Dále byla prokázána závislost mezi pH a obsahem rizikových prvků (Zn, Pb, Fe a Cu) ve vodném výluhu. S klesajícím pH rostou obsahy prvků ve vodném výluhu. V lesních půdách byla také prokázána závislost mezi obsahem Fe ve vodném výluhu a celkovou koncentrací Fe v půdách, podobná závislost byla prokázána i pro Pb. Inhibice byla dále závislá na zákalu, s rostoucím zákalem vzrůstala i inhibice. Množství rozpuštěného uhlíku (humínové kyseliny) mohou výrazně ovlivňovat inhibici u *Vibrio fischeri* v lesních půdách. Tento výsledek je v souladu s informací publikovanými Raclavská et al. (2013).
- Průměrná hodnota inhibice sledované na *Vibrio fischeri* u půd odebraných v intravilánu obce je 44,6 %, a u lesních půd 40,13 %. Významné rozdíly nebyly zjištěny ani mezi průměrnými hodnotami obsahů Cu, Pb a Fe ve vodném výluhu lesních půd a půd intravilánu. Nejvýznamnější rozdíl byl zjištěn u obsahu Zn ve vodném výluhu z lesních půd (59 mg/l), zatímco u půd odebraných v intravilánu je to pouze 18 mg/l.
- Inhibice *Vibrio fischeri* u lesních půd je ovlivněna větším množstvím faktorů než u půd odebraných v intravilánu, kde je rozhodujícím faktorem obsah kovů ve vodném výluhu.

- Hodnoty koncentrace rizikových prvků ve vodném výluhu připraveného z lesních půd i půd intravilánu pro inhibici 30 % jsou nižší než data publikovaná v literatuře.
- Chvostoskok byl použit pro sledování vlivu obsahu Cr na reprodukci. V literatuře se uvádí jako  $EC_{50}$  koncentrace 604 mg/kg (Loch and Jansen). Ve vzorku lesních půd byl stanoven obsah Cr 400 mg/kg, při této koncentraci nebyla zjištěna žádná inhibice reprodukce. Organismy používané v kontaktních testech jsou méně citlivé k obsahům těžkých kovů než akvatické organismy, které reagují na koncentrace v mikrogramech/l.

## **SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

1. ALLOWAY, B. *Heavy metals in soils*. Second edition. Great Britain: Blackie Academic and Professional, an imprint of Chapman and Hall, 1995, s. 368. ISBN 0 7514 0198 6.
2. AN J., JEONG S., MOON H.S., JHO E.H., NAM K. (2012): Prediction of Cd and Pb toxicity to *Vibrio fischeri* using biotic ligand-based models in soil. *Journal of Hazardous Materials*. V. 203– 204, 69 – 76.
3. ANDĚL, Petr. *Ekotoxikologie, bioindikace a biomonitoring*. Vyd. 1. Liberec: Evernia, 2011, 243 s. ISBN 978-80-903787-9-7.
4. BANDOW C., KARAU N., ROMBKE J. (2014): Interactive effects of pyrimethanil, soil moisture and temperature on *Folsomia candida* and *Sinella curviseta* (Collembola). *Applied soil ecology*, V. 81, 22 – 29.
5. BURGA PERÉZ K.F., CHARLATCHKA R., SAHLI L., FÉRARD J.F. (2012): Short Communication. New methodological improvements in the Microtox solid phase assay. *Chemosphere*. V. 86, 105–110.
6. ČSN EN ISO 11348 - 3 Jakost vod – Stanovení inhibičního účinku vzorků vod na světelnou emisi *Vibrio fischeri* (Zkouška na luminiscenční bakterii) – část 3: Metoda s lyofilizovanými bakteriemi. Leden 2000.
7. ČSN EN ISO 1189 – Stanovení fosforu – Spektrofotometrická metoda s molybdenanem amonným, únor 2005.
8. ČSN EN ISO 7027 – Stanovení zákalu, leden 2001.
9. ČSN ISO 21338, *Kvalita vod - kinetické stanovení inhibičních účinků sedimentů, dalších pevných látek a barevných vzorků vod na světelnou emisi Vibrio fischeri*, Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Březen 2013.
10. ČSN ISO 9964 – 3 – Stanovení sodíku a draslíku metodou plamenové emisní spektrometrie, únor 1996.
11. ČVANČAROVÁ M., KŘESINOVÁ Z., CAJTHAML T. (2013): Influence of the bioaccessible fraction of polycyclic aromatic hydrocarbons on the ecotoxicity of historically contaminated soils. *Journal of Hazardous Materials*. V. 254– 255, 116–124.

12. DOŠKÁŘOVÁ, Šárka. *Ekotoxicita kalů z ústřední čistírny odpadních vod Ostrava*. Ostrava, 2012. Disertační práce. VŠB-TU Ostrava, HGF, IEL.
13. FOUNTAIN M.T. and HOPKIN S.P. (2005): *Folsomia candida* (Collembolla): a “standard” soil arthropod., V. 50, 201-222.
14. FROUZ J., HRCKOVA K., LANA J., KRISTUFEK V., MUDRAK O., LUKESOVA A. and MIHALJEVIC M. (2011): *Can laboratory toxicity tests explain the pattern of field communities of algae, plants, and invertebrates along a toxicity gradient of post-mining sites?* Applied Soil Ecology, V. 51, 114-121.
15. FULLADOSA E., MURAT J.C., MARTÍNEZ M., VILLAESCUSA I. (2005). Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. Chemosphere, V. 60, 453-48.
16. HORÁK, Josef, Igor LINHART a Petr KLUSOŇ. *Úvod do toxikologie a ekologie pro chemiky*. Vyd. 1. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická [Praha], 188 s. ISBN 80-7080-548-x.
17. HRYNYŠINOVÁ E. *Výskyt těžkých kovů v oblasti Rybí u Nového Jičína*. Ostrava 2013. Bakalářská práce. VŠB – TU Ostrava, HGF.
18. KAFKA Z., PUNČOCHÁŘOVÁ J.: Biotesty a jejich aplikace v analytice životního prostředí, 1999, Chem. Listy 93, 604 – 606.
19. KELLY CH. J., TUMSARO J. N, LAJOIE C.A. (2004): Assessing wastewater metal toxicity with bacterial bioluminescence in a bench-scale wastewater treatment system. Water res. V 38(2), 423 – 431.
20. KOČÍ, Vladimír a Olga HALOUSKOVÁ. *Ekotoxikologické biotesty 1: sborník pracovní konference*. 1. vyd. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2002, 187 s. ISBN 80-238-9260-6.
21. KOČÍ, Vladimír, Blahoslav MARŠÁLEK a Olga HALOUSKOVÁ. *Ekotoxikologické biotesty 3: sborník pracovní konference*. 1. vyd. Chrudim: Vodní zdroje Ekomonitor, 2003, 191 s. ISBN 80-903203-6-8.
22. KOVÁTS N., FERINCZ A., TURÓCZI B., GELENCSEER A. (2012): Short communication. Direct contact test for estimating the ecotoxicity of aerosol samples. Environmental Toxicology and Pharmacology, V. 33, 284 – 287.

23. KRIŠTOFOVÁ, Dana. *Kovy a životní prostředí: environmentálně nebezpečné složky elektroodpadu*. 1. vyd. Ostrava: VŠB - Technická univerzita Ostrava, 2005, 64 s. ISBN 80-248-0740-8.
24. LAPPALAINEN J., JURONEN R., NURMI J., KARP M (2001): Automated color correction method for *Vibrio fischeri* toxicity test. *Chemosphere*. V. 45, 635-641.
25. LOU W., VERWEIJ R. A., GESTEL A. M. (2014): Assessment of the bioavailability and toxicity of lead polluted soils using a combination of chemical approaches and bioassays with the collembolan *Folsomia Candida*. *Journal of Hazardous Materials*. V. 280, 524 – 530.
26. MA X.Y., WANG C.X., NGO H.H., GUO W., WU N.M., WANG Na. (2014): Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. *Science of the Total Environment*. V. 468–469, 1–11.
27. MELI M., AUCLERC A., PALMQVIST A., FORBES V.E. and GRIMM V. (2013): *Population-level consequences of spatially heterogeneous exposure to heavy metals in soil: An individual-based model of springtails*. *Ecological. Modell.*, V. 250, 338-351.
28. PAVLÍKOVÁ, Daniela. *Ekotoxikologie*. 2. dopl. a přeprac. vyd. V Praze: Česká zemědělská univerzita, Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů, 2008, 171 s. ISBN 978-80-213-1843-4.
29. PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4. aktualiz. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT, 2009, viii, 579 s. ISBN 978-80-7080-701-9.
30. PJŮROVÁ B., MATÝSEK D., DROZDOVÁ J., HRYNYŠINOVÁ E. (2014): Ecotoxicological Assessment of Soils Formed by Weathering of Igneous Rocks of Teschenite-Picrite Association (Beskydy Mountains, Czech Republic), V. 700, 344-349.
31. PROKEŠ, Jaroslav. *Základy toxikologie: Obecná toxikologie a ekotoxikologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, 248 s. ISBN 80-7262-301-x.
32. RACLAVSKÝ K., H. RACLAVSKÁ, D. MATÝSEK, V. HOMOLA. *Geochemie – multimediální texty*, CD-ROM. MS VŠB – TU Ostrava, 2009.
33. ROCHA L., RODRIGUES S.M., LOPES I., SOARES A.M.V.M., DUARTE A.C., PEREIRA E. (2011): The water-soluble fraction of potentially toxic elements in

- contaminated soils: Relationships between ecotoxicity, solubility and geochemical reactivity. *Chemosphere*. V. 84, 1495–1505.
34. SCHEERER S., GOMEZ F., LLOYD D. (2006): Bioluminescence of *Vibrio fischeri* in continuous culture: Optimal conditions for stability and intensity of photoemission. *Journal of Microbiological Methods*. V. 67, č. 2, 321-329.
35. ŠPUNDA, V. *Biologie, ekologie*: Sborník prací přírodovědecké fakulty Ostravské univerzity. 1. vyd. Ostrava: REPROINS, 2001, s. 188. ISBN 80-7042-811-2.
36. ŠUDOMA, Marek. *Hodnocení ekotoxicity lesních půd vybranými testy*. Brno, 2013.
37. TICHÝ, Miloň. *Toxikologie pro chemiky: toxikologie obecná, speciální, analytická a legislativa*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1998, 90 s. ISBN 80-7184-625-2.
38. TREBICHA VSKÝ, J., D. HAVRDOVÁ a M. BLOHBERGER. *Škodliviny I: Toxické kovy*. Kutná Hora: NSO, 1998.
39. TSIRIDIS V., PETALA M., SAMARAS P., HADJISPYROU S., SAKELLAROPOULOS G., KUNGOLOS A. (2006): Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. *Cotoxicology and environmental safety*. V. 63, 158 - 167
40. Vyhláška č. 294/2005 Sb. Vyhláška o podmínkách ukládání odpadů na skládky a jejich využívání na povrchu terénu a změně vyhlášky č. 383/2001 Sb., o podrobnostech nakládání s odpady, červenec 2005.
41. ZECHNER, V. *Technologické možnosti využití SEZ z báňské činnosti v oblasti Karlovarského kraje*. Ostrava 2013. Disertační práce. VŠB – TU Ostrava, HGF.



### ***INTERNETOVÉ ODKAZY***

1. Toxikologie, toxicita. *Vscht* [online]. 2010 [cit. 2014-11-10]. Praha. Dostupné z:  
<http://old.vscht.cz/document.php?docId=8130>

## ***SEZNAM OBRÁZKŮ***

Obrázek 1: Vzorkovací síť vymezeného území, v měřítku 1:80 000 (HRYNYŠÍNOVÁ, 2013).....	20
Obrázek 2: <i>Folsomia candida</i> (zdroj: <a href="http://www.enfo.agt.bme.hu">www.enfo.agt.bme.hu</a> ) .....	21

## ***SEZNAM TABULEK***

Tabulka 1: Dělení toxických látek podle kritérií WHO (Světová zdravotnická organizace) a EPA (Úřad pro ochranu ŽP v USA (PAVLÍKOVÁ et al., 2009) .....	5
Tabulka 2: Hodnoty aritmetického průměru (geochemické pozadí) vybraných rizikových prvků v půdách oblasti Rybí (mg/kg), oranžově vyznačeny vyšší obsahy prvků těšínové asociace (HRYNYŠÍNOVÁ, 2013) .....	19
Tabulka 3: Obsah prvků v lesní půdě a ve vzorku testovaném na ekotoxicitu chvostoskoka (PJUROVÁ et al., 2014).....	23
Tabulka 4: Chemizmus půd v zájmové oblasti Rybí u Nového Jičína (HRYNYŠÍNOVÁ, 2013).....	23
Tabulka 5: Výsledky pH, vodivosti a inhibice pro vodný výluh .....	25
Tabulka 6: Výsledky pH, vodivosti a inhibice pro suspenzi .....	26
Tabulka 7: Hodnoty zákalu pro jednotlivé vzorky půdy v intravilánu .....	34
Tabulka 8: Hodnoty zákalu pro jednotlivé vzorky lesní půdy .....	35
Tabulka 9: Rozbor obsahu kovů ve vodném výluhu.....	36
Tabulka 10: Průměrné koncentrace prvků ve vodném výluhu při inhibičním účinku do 30% na <i>V. fischeri</i> (DOŠKÁŘOVÁ, 2012; ZECHNER, 2013) .....	40

## ***SEZNAM GRAFŮ***

Graf 1: Závislost inhibice ve vodném výluhu na celkovém obsahu Zn .....	27
Graf 2: Závislost mezi inhibicí a pH (H <sub>2</sub> O) v rámci intravilánu obce pro vodný výluh .....	28
Graf 3: Závislost mezi inhibicí a pH (H <sub>2</sub> O) v rámci lesních půd pro vodný výluh .....	28
Graf 4: Závislost mezi inhibicí a celkovým obsahem Mn .....	29
Graf 5: Závislost mezi inhibicí a celkovým obsahem Zn .....	29
Graf 6: Závislost mezi inhibicí a pH (H <sub>2</sub> O) v rámci lesních půd pro suspenzi .....	30
Graf 7: Závislost mezi vodivostí a inhibicí v rámci lesních půd .....	31

Graf 8: Srovnání výsledků inhibice ve výluhu a inhibice v suspenzi v rámci intravilánu obce. ....	31
Graf 9: Srovnání výsledků inhibice ve výluhu a inhibice v suspenzi v rámci lesních půd .	32
Graf 10: Srovnání výsledků inhibice ve výluhu a inhibice v suspenzi v rámci lesních půd	32
Graf 11: Srovnání výsledků inhibice ve výluhu a inhibice v suspenzi v rámci intravilánu obce .....	33
Graf 12: Závislost mezi inhibicí a zákalem ve vodném výluhu v rámci půd z intravilánu .	34
Graf 13: Závislost mezi inhibicí a zákalem ve vodném výluhu v rámci lesních půd .....	35
Graf 14: Závislost mezi obsahem Pb ve vodném výluhu a inhibicí V. fischeri .....	37
Graf 15: : Závislost mezi obsahem Fe ve vodném výluhu a inhibicí V. fischeri.....	37
Graf 16: Závislost mezi obsahem Zn ve vodném výluhu a inhibicí V. fischeri .....	37
Graf 17: Závislost mezi obsahem Pb ve vodném výluhu a inhibicí V. fischeri .....	38
Graf 18: Závislost mezi obsahem Zn ve vodném výluhu a pH/H <sub>2</sub> O .....	38
Graf 19: Závislost mezi obsahem Pb ve vodném výluhu a pH/H <sub>2</sub> O.....	38
Graf 20: Závislost mezi obsahem Fe ve vodném výluhu a pH/H <sub>2</sub> O.....	39
Graf 21: Závislost mezi obsahem Cu ve vodném výluhu a pH/H <sub>2</sub> O .....	39
Graf 22: Závislost mezi obsahem Fe ve vodném výluhu a celkovým obsahem Fe v sušině zemin .....	39
Graf 23: Závislost mezi obsahem Pb ve vodném výluhu a celkovým obsahem Pb v sušině zemin .....	40

## **PŘÍLOHY**

### **Ecotoxicological Assessment of Soils Formed by Weathering of Igneous Rocks of Teschenite-Picrite Association (Beskydy Mountains, Czech Republic)**

Barbora Pjurova<sup>1,a</sup>, Dalibor Matysek<sup>1,b</sup>, Jarmila Drozdova<sup>1,c</sup> and Eliška  
Hrynysínová<sup>1,d</sup>

<sup>1</sup>VŠB - Technical University of Ostrava, 17. listopadu 15, 708 33, Ostrava - Poruba, Czech  
Republic

<sup>a</sup>[barbora.pjurova@vsb.cz](mailto:barbora.pjurova@vsb.cz), <sup>b</sup>[dalibor.matysek@vsb.cz](mailto:dalibor.matysek@vsb.cz), <sup>c</sup>[JarmilaSchwalbova@seznam.cz](mailto:JarmilaSchwalbova@seznam.cz),

<sup>d</sup>[eliska.hrynysinova@vsb.cz](mailto:eliska.hrynysinova@vsb.cz)

**Keywords:** Teschenite; Picrite; *Folsomia candida*; Ecotoxicity; Chromium

**Abstract.** Increased concentrations of trace elements in rocks of teschenite-picrite association should also be reflected in the soils developed on these rocks. An addition of biochar to contaminated soils can be effective in decreasing of inorganic contaminants. The threshold of geochemical anomaly for soils overlying the teschenite association and the influence of chromium (Cr) concentration on its mobility after biochar amendment using *F. candida* as testing organism were determined. The inhibition was not demonstrated in the tested soil with a concentration of Cr at 400 mg Cr/kg. High concentrations of Cr in soils were associated with the presence of chromspinel, which is resistant to the weathering processes. A significant stimulatory effect was found after the addition of biochar made of wood in the sample with 10% of PL ( $p = 0.0402$ ) amendment and the sample with 5 % of AC ( $p = 0.0229$ ) amendment.

#### **Introduction**

The ecotoxicity of soils may be significantly affected by the contents of heavy metals [1]. The effect of soil contamination on its ecotoxicity is assessed mainly as a result of anthropogenic activities, mostly during the reclamation of a territory. Aquatic ecosystems are used for evaluation of ecotoxicity more often than terrestrial tests [2]. The terrestrial tests, in particular terrestrial bioassays such as Collembola *Folsomia candida* are used for

assessment of impact of basic igneous rocks (i.e., teschenite) on soil ecotoxicity. These rocks exhibit naturally increased contents of some heavy metals (Cr, Ni, and Zn).

The teschenite-picrite rocks typically occur in the area of Beskydy Mountains, Podbeskydy upland and the surrounding area in Czech Republic and Poland. This area belongs to the Outer Western Carpathians. The name Teschenite is derived from Poland and Czech town Cieszyn (Teschen), resp. Český Těšín. Teschenite association consists of complex variety of volcanic, pyroxenic or amphibolic rocks belonging to teschenites, picrites, monchiquites (fourchites and ouachitites) and teschenite pyroxenites. These igneous rocks form sills and submarine lava that flows up to 30 meters in thickness in the Lower Cretaceous sediments (mainly barrem to apt). Rocks of teschenite association occur frequently in the south of Nový Jičín (Fig. 1).

Teschenites are relatively coarse types of rocks that besides plagioclase also contain analcime or natrolite. Picrites are dark rocks with a significant amount of olivine which usually creates phenocrysts in pyroxenic matrix. Lamprophyritic rocks (monchiquites, fourchites, and ouachitites) are typical aphanitic structures and contain predominantly dark minerals such as (i) monchiquit that contains olivine + pyroxenes and amphiboles; and (ii) fourchit that is composed mainly of pyroxenes and ouachitit and contains a significant proportion of biotite. Rocks of teschenite-picrite association are also characterized by a high degree of post-volcanic alteration (chloritisation, smectitisation, carbonatization, etc.).

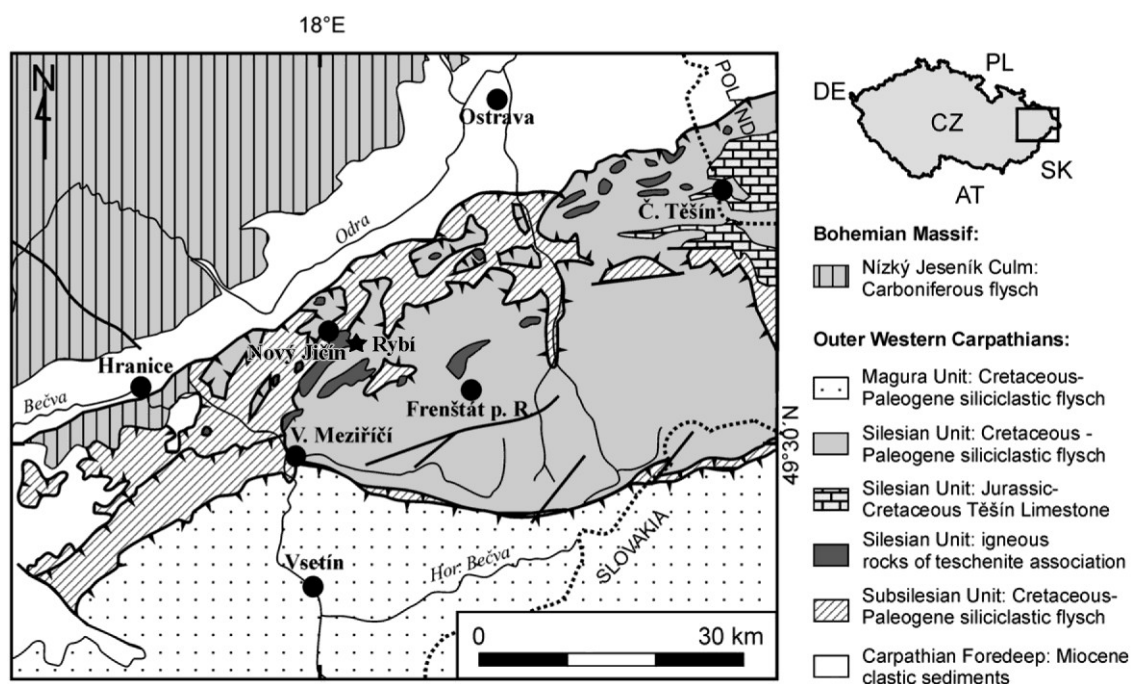


Fig. 1 Occurrence of rocks of teschenite association and off-take point of soils [3]

The rocks of teschenite association contain the following major minerals: olivine, clinopyroxene (diopside, augite, traces egirinaugite), amphibole (kaersutite), biotite, plagioclase (albite, andesine-labradorite), potassium feldspar (anorthoclase, microcline), analcime or natrolite, magnetite or other spinelides, apatite, chlorite and accessories, and secondary minerals. The chemical composition of spinelides in picrite varies considerably and ranges from chromite-rich Al to Ti-magnetite. Teschenite contains only Fe-Ti spinelides (Ti-magnetite-Ti-maghemite). Rocks of teschenite-picrite association have higher concentrations of  $P_2O_5$ ,  $TiO_2$ , alkalis, trace elements such as Cr, Ni, Cu, Zr, Ba and Sr, and rare earth elements (REE) [4].

Increased concentrations of trace elements in rocks of teschenite-picrite association should be also reflected in soils developed on these rocks. The soils that are formed on the rocks of teschenite association are mostly eutrophic cambisols. Therefore, the assessment of geochemical background of soil formed during weathering of rocks of teschenite association is very important particularly in terms of identifying the "risk concentration" that can influence the health of ecosystem.

The impact of high concentrations of metals in soils on their ecotoxicity is frequently reduced by addition of biochar [5,6]. Biochar is a carbon-rich product of biomass pyrolysis. It is formed by breaking down of organic substances at temperatures ranging from 350°C - 1000°C in a low-oxygen (<2%) thermal process. Biochar was found to be effective in decreasing both organic and inorganic contaminants, particularly because of its large surface area and cation exchange capacities (negative charge) [7].

Parthenogenetic collembolans *Folsomia candida* have been chosen for this ecotoxicological study due to their abundance and diversity widely used to assess the environmental impacts of a different range of pollutants in soil. Collembolans *Folsomia candida* play an important role in the functioning of the ecosystem and are sensitive to soil contamination [8]. Previous study of Lock and Janssen [9] shows the  $EC_{50}$  value for Cr in soils was 604 mg/kg in 28-days reproduction test.

The aim of this study was to determine the threshold of geochemical anomaly for soils overlying the teschenite association and to assess the influence of Cr concentration on its mobility after a biochar addition. To indicate the decreasing mobility of heavy metals after biochar addition, biological assessments with Collembolans *Folsomia candida* were performed.

## Materials and methods

**Rock and soil sample preparation and analysis.** The rock samples were collected from outcrops of picrite, teschenite, monchiquite, fourchite of the Moravian-Silesian Beskydy. The soil samples were taken from the municipality Rybí (the area of Nový Jičín) (Fig. 1). The total number of 33 and 56 rock and soil samples were collected, respectively. The samples were grounded, milled and prepared for chemical analysis according to the U.S. EPA method 6200:2005 Field portable X-ray fluorescence spectrometry by X-ray fluorescence spectrometer Olympus Innov X, Model DELTA PROFESSIONAL. The following elements were analyzed: Mg, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, Cr, Mn, Ni, Co, Cu, Zn, As, Rb, Sr, Mo, Pb, Th, Zr, and Y.

The samples of forest soils (28 samples) were collected from the humus horizon and other 28 samples were collected from agricultural soils in Rybí surrounding. Soil samples were first dried in the oven at a temperature below 40 °C, then homogenized, sieved to a size below 2 mm, milled and finally analyzed by X-ray fluorescence spectrometer. The geochemical background (i.e., arithmetic mean) and the threshold geochemical anomaly (i.e., arithmetic mean and double standard deviation) were calculated according to the ISO 19258:2005 Soil quality - Guidance on the determination of background values.

**Soil – biochar mixtures preparation.** A sample of soil containing high concentrations of Cr or Fe was chosen for the bioassay test. The sample was defaunated by thawing – freezing process (two cycles of 48 h at -20°C followed by 48 h at room temperature) and mixed with biochars and activated charcoal (AC) (Totpur, Castellbell i el Vilar) at a 0% (control sample), 5%, and 10% (w/w) rate. Two types of biochars were used (i) PL biochar made from *Pinus pinaster* + *P. radiata* wood chip produced in a slow pyrolysis reactor at 500 – 550 °C, and (ii) PG biochar made of the same feedstock produced in a gasification reactor at 600-900 °C. Prior to the test, water holding capacity (WHC) in control and soil-biochar mixtures were assessed gravimetrically. The day before the start of the test, the soil-biochar mixtures were moistened to 40% of the WHC. For each concentration, 11 replicates were prepared, each consisting on 25 g of wet mixture added to a 125 ml polyethylene cup. Eight of the replicates were used for the bioassays and three for the measurement of pH. For this purpose, at the end of the test, soil–biochar aqueous extracts were prepared at a ratio of 1:5 (10 g of wet soil-biochar mixture in 50 ml of distilled water), followed by agitation for 2 hours at 60 rev.min<sup>-1</sup> and filtering through Whatman 42 filter paper.

**Ecotoxicity testing.** A 28-days reproduction test (ISO 11267 - Soil quality - Inhibition of reproduction of Collembola (*F. candida*) by soil pollutants) was used to assess ecotoxicity of soils. According to standardized guideline, 10 individuals (10 - 12 day old) were put into each replicate. Food (dry yeast) was provided at the beginning of the test and after 14 days and aeration was ensured (twice a week). After 28 days vessels were flooded with water to float organisms to the surface and pictures were taken using a digital camera. Adults and juveniles were counted using ImageJ v1.43 software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

## Results and discussion

**Geochemistry of rocks and soils.** The geochemical study of rocks indicates that monchiquite varies the most within the group of rocks. The values of the geochemical background shows:

- The highest concentrations of Mn, Sr, Fe, and Ti in monchiquite.
- That the highest concentrations of geochemical background for Cr, Ni and higher concentration of Zn were determined in picrite. The box-and-whisker plots for Cr and Zn are shown in Fig. 2.
- Increased concentrations of Cr and Ni in picrite are related to the presence of olivine and pyroxene. Chromium may also be present in the form of chromspinelide.
- In the forest soils formed on rocks of teschenite association, the contents of Cr ranged from 51 to 695 mg/kg, Cu from 17.6 to 41.2 mg/kg, and Zn from 62 to 223 mg/kg.

The contents of heavy metals in the soil used in ecotoxicity bioassay are listed in Table 1.



Rocks	Results	Ca	Fe	Ti	Cr	Cu	Ni	Ba	Zn
		(% )			(mg/kg)				
Teschenite	Background	8.87	8.28	1.81	497	33	50	829	94
	Threshold	9.26	4.78	1.73	1612	44	726	720	100
Picrite	Background	11.49	8.63	0.15	757	53	324	1650	123
	Threshold	30.09	12.79	0.20	1644	84	822	4322	209
Fourchite	Background	8.48	8.36	1.96	302	64	141	871	148
	Threshold	12.70	9.98	2.52	1739	115	711	1260	509
Monchiquite	Background	10.79	10.14	2.47	257	29	32	1413	125
	Threshold	16.68	16.38	4.95	274	44	34	1801	172
Forest soils	Background	1.12	3.42	0.62	165	23	54	LOD	111
	Threshold	4.02	7.33	1.40	631	42	85	LOD	224
Forest soils	Ecotoxicity	1.45	5.57	0.95	393	22	LOD	LOD	218

Table 1: The most important elements in rock of teschenite association and forest soils  
LOD - below the detection limit

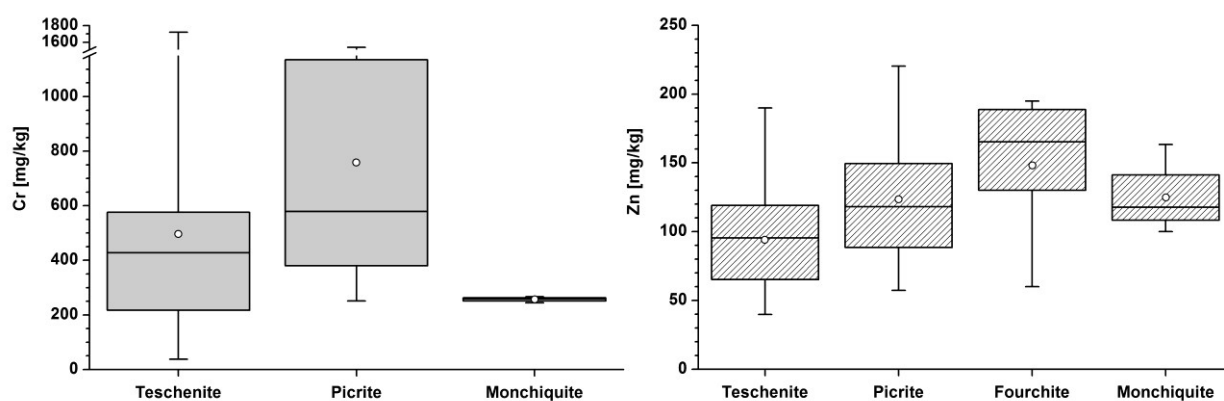


Fig. 2 Box-and-whisker plots for the concentrations of Cr and Zn in the teschenite association

***F. candida* reproduction test.** Control soils (artificial) have met the validity criteria (ISO 11267). The mortality of the adults did not exceed 20%, the reproduction rate per control vessel was above 100 instars and coefficient of variation was within accepted limits – less than 30%. The differences between each treatment (biochar %) and the control

sample were evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post-hoc test (if significant differences existed between concentrations - significance level 0.05). The results were expressed as a percentage of mean reproduction in the controls. Thus, the values  $>100$  corresponded to a global stimulation of reproduction, while the values  $<100$  indicated global inhibition. Biochar and AC amendment in our soil demonstrated stimulatory effects on collembola reproduction. According to post-hoc Dunnet test, significant differences with respect to control sample were found only in a mixture with 10% of PL ( $p = 0.0402$ ) and 5% of AC ( $p = 0.0229$ ). The pH values in soils amended with biochar and AC (in the range from 5.95 to 6.33) were slightly higher than in control soil (with pH value of 5.65), except the sample with 5% of AC (with pH value of 5.58). This is due to the fact that the pH in biochar in general is alkaline, therefore causes liming effect in the soil, the immobilization of metals (also affects the sorption) and the mobilization of oxyanion [10].

The effects of biochar on soil fauna have not been fully elucidated. According to Lehmann et al. [10], sorption phenomena, pH, and physical properties (i.e., pore structure, surface area, and mineral substances) play an important role. Addition of biochar to the soil may have potential direct or indirect effect on soil invertebrates. Direct effects are release of salts, heavy metals or organic substances. Indirect effects are changes in the environment such as changes in pH, moisture, aeration, porosity, salinity, and water retention [11].

According to Frouz et al. [12], pH is the most important factor affecting the toxicity. The acidic pH may affect the organisms not only directly, but also it can result in a high availability of Al, Fe, and heavy metals. The lower the pH and organic matter in the soil, the higher the negative impact on the reproduction of *F. candida*. The importance of pH in reproduction of *F. candida* has been also shown by Chapman et al. [6]. *F. candida* tolerates pH in the range from 3.2 to 7.7 and the optimum in terms of reproduction is pH in the value of 6.0. Forest soil from Rybí after biochar amendment achieves this optimum value. In general, springtails are more sensitive to the effects of organic matter than of metals [13].

According to Marks et al. [14], biochar properties can be significantly affected by the applied pyrolysis technology. The comparison of wood chars showed that pyrolysis method had the strongest influence on the ratios of C:P (i.e., the highest content of P was

detected in the low-temperature pyrolysis materials), whereas feedstock determined the C:N ratios (the content of N was more comparable within feedstocks).

The results showed, that the addition of biochar made of wood chips had stimulating effect on collembola reproduction, and increased with dose (Fig. 3). Strong stimulatory effects on collembola reproduction were also confirmed by Marks et al. [14] for wood slow and fast pyrolysis biochars. A stimulatory effect can also be affected by the extractable content  $(\text{HPO}_4)^{2-}$  and  $\text{K}^+$  from biochar, however no evidence of significant relation between the content of  $(\text{NH}_4)^+$  and pH and reproduction of *F. candida* were found [14].

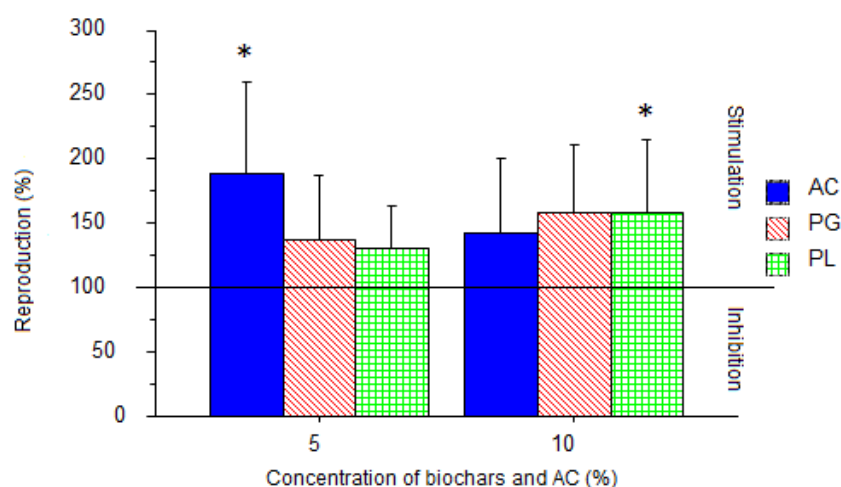


Fig. 3 Collembola reproduction considered as a percentage of mean reproduction in the controls (100% - control). Error bars correspond to the standard deviation. \*Indicates statistically significant difference with respect to the control. AC – activated charcoal, PL – slow pyrolysis biochar, PG – gasification biochar

## Conclusion

The soils developed during erosion of rock from teschenite association do not exhibit inhibitory effect on *F. candida*. The inhibition at concentration of 400 mg Cr/kg was also not demonstrated. High concentrations of Cr in soils were associated with the presence of chromspinel, which is resistant to weathering processes and it is not released to the environment. A significant stimulatory effect was found after addition of biochar made of wood. The difference in the stimulatory effects of biochars produced by pyrolysis at 600-900 °C and at 500-550 °C was minimal, particularly given by the chemical composition of the pyrolysed material.

## Acknowledgements

This paper was supported by research projects of the Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic: SP2014/54 The research of catalysts and technical parameters influence on properties and efficiency of technological gasses in installation for thermochemical degradation, and project New creative teams in priorities of scientific research, reg. no. CZ.1.07/2.3.00/30.0055, supported by Operational Programme Education for Competitiveness and co-financed by the European Social Fund and the state budget of the Czech Republic. Special thanks belongs to Xavier Domene, PhD. (Universitat Autònoma de Barcelona) for providing the material support, professional advice and assistance during the implementation of ecotoxicological assays.

## References

- [1] C. Lors, J.-F. Ponge, M.M. Aldaya and D. Damidot: *Comparison of solid-phase bioassays and ecoscores to evaluate the toxicity of contaminated soils*. Environ. Pollut., Vol. 158 (2010), pp. 2640-2647.
- [2] H. Raclavska, S. Doskarova and H. Skrobankova: *Ecotoxicity of sewage sludge from waste water treatment plant*. Inzynieria Mineralna, Vol. 27 (2011), pp. 39-50.
- [3] Z. Dolnicek, K. Kropac, P. Uher and M. Polach: *Mineralogical and geochemical evidence for multi-stage origin of mineral veins hosted by teschenites at Tichá, Outer Western Carpathians, Czech Republic*. Chem. Erde, Vol. 70 (2010), pp. 267-282.
- [4] R. Wlodyka and L. Karwowski: *A mesozoic volcanic rock series in the Polish Western Carpathians*. Pol. Tow. Mineral., Pr. Spec. 22 (2003), pp. 248-255.
- [5] M. Ahmad, A.U. Rajapaksha, J.E. Lim, M. Zhang, N. Bolan, D. Mohan, M. Vithanage, S.S. Lee and Y.S. Ok: *Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: A review*. Chemosphere, Vol. 99 (2014), pp. 19-33.
- [6] E.E.V. Chapman, G. Dave and J. D. Murimboh: *A review of metal (Pb and Zn) sensitive and pH tolerant bioassay organisms for risk screening of metal-contaminated acidic soils*. Environ. Pollut., Vol. 179 (2013), pp. 326-342.
- [7] J. Tang, W. Zhu, R. Kookana and A. Katayama: *Characteristics of biochar and its application in remediation of contaminated soil*. J. Biosci. Bioeng., Vol. 116 (2013), pp. 653-659.

- [8] M. Meli, A. Auclerc, A. Palmqvist, V.E. Forbes and V. Grimm: *Population-level consequences of spatially heterogeneous exposure to heavy metals in soil: An individual-based model of springtails*. Ecol. Modell., Vol. 250 (2013), pp. 338-351.
- [9] K. Lock and C.R. Janssen: *Ecotoxicity of Chromium (III) to Eisenia fetida, Enchytraeus albidus, and Folsomia candida*. Ecotoxicol. Environ. Saf., Vol. 51 (2002), pp. 203-205.
- [10] J. Lehmann, M.C. Rillig, J. Thies, C.A. Masiello, W.C. Hockaday and D. Crowley: *Biochar effects on soil biota - A review*. Soil Biol. Biochem., Vol. 43 (2011), pp. 1812-1836.
- [11] W. Didden and J. Römbke: *Enchytraeids as indicator organisms for chemical stress in terrestrial ecosystems*. Ecotoxicol. Environ. Saf., Vol. 50 (2001), pp. 25-43.
- [12] J. Frouz, K. Hrková, J. Lana, V. Kristufek, O. Mudrak, A. Lukesová and M. Mihaljević: *Can laboratory toxicity tests explain the pattern of field communities of algae, plants, and invertebrates along a toxicity gradient of post-mining sites?* Applied Soil Ecology, Vol. 51 (2011), pp. 114-121.
- [13] M.T. Fountain and S.P. Hopkin: *Folsomia candida (Collembolla): a "standard" soil arthropod*. Annu. Rev. Entomol., Vol. 50 (2005), pp. 201-222.
- [14] E.A.N. Marks, S. Mattana, J.M. Alcaniz and X. Domene: *Biochars provoke diverse soil mesofauna reproductive responses in laboratory bioassays*. Eur. J. Soil Biol., Vol. 60 (2014), pp. 104-111.